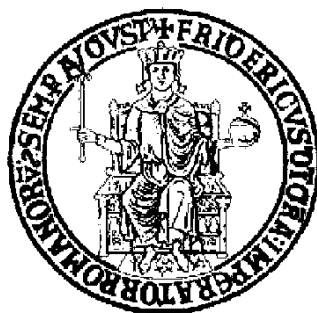


Università degli Studi di Napoli *Federico II*



Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie e Agro-Alimentari

**Dottorato di Ricerca
in
Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari**

**Indirizzo Acquacoltura
XXV Ciclo**

**Centro interdipartimentale di ricerca per la gestione
delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura**

***Motilità e criopreservazione di spermatozoi di
organismi marini: applicazioni biotecnologiche
in acquacoltura ed ambiente***

Coordinatore

Ch.mo Prof. Giancarlo BARBIERI

Relatore

Ch.mo Prof. Giovanni SANSONE

Co-Relatore

Ch.mo Prof. Jaime Fernando FERREIRA

Dottorando

Fausto SILVESTRI

Indice

| | |
|--|----|
| PREMESSA | 5 |
| 1 STATO DEL ARTE | 6 |
| 1.1 Motilità spermatica e criopreservazione | 6 |
| Motilità spermatica | 6 |
| Criopreservazione | 8 |
| 1.2 Utilizzo di seme criopreservato in saggi ecotossicologici | 11 |
| 1.3 Bibliografia | 13 |
| 2 SCOPO DELLA RICERCA E PIANO SPERIMENTALE | 24 |
| 2.1 Scopo della Ricerca | 25 |
| 2.2 Piano Sperimentale | 26 |
| 3 RISULTATI E DISCUSSIONI | |
| 3.1 Acquisizione conoscenza sulla motilità spermatica | 29 |
| 3.2 Materiali e Metodi | 29 |
| 3.2.1 Le specie mediterranee | |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 29 |
| <i>Tapes decussatus</i> | 31 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 32 |
| 3.2.2 Le specie alloctone | |
| <i>Crassostrea gigas</i> | 33 |
| <i>Tapes philippinarum</i> | 34 |
| 3.2.3 Le specie del litorale brasiliano | |
| <i>Perna perna</i> | 36 |
| <i>Crassostrea brasiliana (gasar)</i> | 38 |
| <i>Crassostrea rhizophorae</i> | 39 |
| <i>Nodipecten nodosus</i> | 40 |
| 3.3 Risultati e Discussioni | 42 |
| 3.3.1 Le specie mediterranee | |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 42 |
| <i>Tapes decussatus</i> | 45 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 46 |
| 3.3.2 Le specie alloctone | |
| <i>Crassostrea gigas</i> | 47 |
| <i>Tapes philippinarum</i> | 49 |
| 3.3.3 Le specie del litorale brasiliano | |
| <i>Perna perna</i> | 52 |
| <i>Crassostrea brasiliana (gasar)</i> | 55 |
| <i>Crassostrea rhizophorae</i> | 58 |
| <i>Nodipecten nodosus</i> | 60 |
| 3.4 Conclusioni | 62 |
| 3.5 Bibliografia | 63 |

| | |
|---|-----|
| 3.6 Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie acquacolturali | 66 |
| 3.7 Materiali e Metodi | |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 66 |
| <i>Perna perna</i> | 67 |
| <i>Crassostrea brasiliana</i> (gasar) | 68 |
| <i>Nodipecten nodosus</i> | 69 |
| 3.8 Risultati e Discussioni | |
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 70 |
| <i>Perna perna</i> | 73 |
| <i>Crassostrea brasiliana</i> (gasar) | 75 |
| <i>Nodipecten nodosus</i> | 78 |
| 3.9 Conclusioni | 82 |
| 3.10 Bibliografia | 83 |
| 3.11 Ottimizzazione e progettazione di biosaggi con spermatozoi criopreservati | 86 |
| 3.12 Materiali e Metodi | |
| Ottimizzazione del biosaggio con seme criopreservato di orata | 86 |
| Progettazione di biosaggi con seme di molluschi marini | 88 |
| 3.13 Risultati e Discussioni | |
| Ottimizzazione del biosaggio con seme criopreservato di orata | 89 |
| Progettazione di biosaggi con seme di molluschi marini | 91 |
| 3.14 Conclusioni | 94 |
| 3.15 Bibliografia | 95 |
| 3.16 Glossario | 97 |
| Appendice 1 Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Rinna F, Silvestri F, Sorrenti G, Vitiello V, Sansone G (2012) Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: sensitivity and reliability of cryopreserved <i>Sparus aurata</i> spermatozoa. <i>Ecotox and Environ Saf</i> 84:293-298. | 98 |
| Appendice 2 Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Rinna F, Sessa R, Silvestri F, Villani G, Vitiello V, Sansone G. Sperimentazione di nuovo biosaggi per le indagini ecotossicologiche: il test di spermiotossicità con seme criopreservato. XIII Congresso nazionale di chimica dell'ambiente e dei beni culturali, Taranto, Italia, 2012, p. 97. | 99 |
| Appendice 3 Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Rinna F, Sessa R, Silvestri F, Villani G, Vitiello V, Sansone G. CRYO-Ecotest: a new tool for the ecotoxicological evaluation of aquatic environments. V Giornate di Studio ISPRA, Livorno, 2012. | 100 |
| Appendice 4 Vitiello V, Langellotti AL, Del Prete F, Silvestri F, Rinna F, Sansone G. Effect of short-term conservation and exposure to five different cryoprotectants on sperm motility of <i>Pagellus erythrinus</i> (L.) 3rd International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Budapest, Hungary, 2011, p. 148-149. | 101 |
| Appendice 5 Silvestri F, Rinna F, Del Prete F, Langellotti AL, Vitiello V, Fabbrocini A, Sansone G. Nuovo biosaggio ecotossicologico per sedimenti di ecosistemi acquatici. V Congresso Lagunet 2011, Lesina, Italia, 2011, p. 58. | 103 |
| Appendice 6 Vitiello V, Silvestri F, Rinna F, Del Prete F, Langellotti AL, Barone CMA, Sansone G. Sperm motility of mediterranean aquacultured finfish species. World Aquaculture Society Conference, Natal, Brazil, 2011. | 104 |
| Appendice 7 Del Prete F, Silvestri F, Rinna F, Vitiello V, Langellotti AL, Barone CMA, Sansone G. Sperm motility of three mediterranean bivalve molluscs. World Aquaculture Society Conference, Natal, Brazil, 2011. | 105 |

ABSTRACT

In most aquatic organisms, especially those that have external fertilization, sperm motility is a fundamental parameter for the success of fertilization. In fact the knowledge of sperm motility can be very useful in the aquaculture and ecotoxicological sectors improving breeding procedures, cryopreservation protocols and spermotoxicity assays. In this sense, this study aimed to: (1) obtain the basic knowledge on sperm motility of aquaculture marine organisms; (2) propose and optimize protocols for sperm cryopreservation; (3) propose and optimize ecotoxicological tests using cryopreserved sperm. For this we used the Mediterranean native organisms *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes decussatus*, *Paracentrotus lividus* and *Sparus aurata*, the alien molluscs cultured in Italy *Crassostrea gigas* and *Tapes philippinarum* and the Brazilian native molluscs *Perna perna*, *Crassostrea brasiliensis*, *Crassostrea rhizophorae* and *Nodipecten nodosus*. *N. nodosus*, *M. galloprovincialis* and *T. decussatus* showed the best performance in the general evaluation of physiological parameters of sperm motility. In general the method of sperm acquisition affected the performance of sperm motility of the studied species. For some species, the stored sperm at low temperatures for a short period has proved viable after activation. The *N. nodosus* sperm showed good viability to cryopreservation through the addition of EG 7% for 10 minutes of adaptation at room temperature and freezing gradient of $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A reduced sperm motility was observed after cryopreservation and thawing of *P. lividus*, *P. perna* and *C. brasiliensis*. The ecotoxicological assay through *S. Aurata* cryopreserved sperm demonstrated a remarkable potential as an universal test in the evaluation of different aquatic ecosystems. The species *M. galloprovincialis*, *T. decussatus* and *N. nodosus* were considered as potentially useful with biological systems in spermotoxicity tests.

RESUMO

Na maioria dos organismos aquáticos, principalmente naqueles que apresentam fecundação externa, a motilidade espermática é um parâmetro fundamental para o êxito da fertilização. De fato o conhecimento da motilidade espermática pode ser muito útil nos setores da aquicultura e ecotoxicologia otimizando protocolos de reprodução artificial, criopreservação e testes espermiotoxicidade. Neste sentido, este estudo teve como objetivos: adquirir conhecimentos de base sobre a motilidade espermática de organismos marinhos aplicados à aquicultura; (2) otimizar e projetar protocolos de criopreservação de sêmen; (3) otimizar e projetar testes ecotoxicológicos utilizando sêmen criopreservado. Para isso foram utilizados os organismos autóctones do Mediterrâneo *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes decussatus*, *Paracentrotus lividus* e *Sparus aurata*, os moluscos alóctones cultivados na Itália *Crassostrea gigas* e *Tapes philippinarum* e moluscos autóctones do litoral brasileiro *Perna perna*, *Crassostrea brasiliana*, *Crassostrea rhizophorae* e *Nodipecten nodosus*. Conforme observado nos resultados *N. nodosus*, *M. galloprovincialis* e *T. decussatus* apresentaram o melhor desempenho na avaliação geral dos parâmetros fisiológicos da motilidade espermática. Em geral o método de obtenção do sêmen influenciou no desempenho da motilidade espermática das espécies estudadas. Para algumas espécies o sêmen conservado resfriado por um curto período mostrou-se viável após a ativação. O sêmen de *N. nodosus* apresentou uma alta resistência para a criopreservação mediante a utilização de EG 7% por 10 minutos de equilíbrio sob temperatura ambiente e gradiente de congelamento de $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Por outro lado foi observada uma escassa motilidade espermática após a criopreservação do sêmen de *P. lividus*, *P. perna* e *C. brasiliana*. O teste ecotoxicológico com sêmen criopreservado de *S. aurata* demonstrou um notável potencial como teste universal na avaliação de diferentes ecossistemas aquáticos, assim como as espécies *M. galloprovincialis*, *T. decussatus* e *N. nodosus* foram consideradas sistemas biológicos potencialmente utilizáveis em testes de espermiotoxicidade.

PREMESSA

La motilità spermatica è un fattore fondamentale per l'esito della fecondazione negli organismi acquatici, soprattutto per quelli che presentano fecondazione esterna. Per mezzo della motilità spermatica è possibile determinare la qualità del seme. Questo parametro è tradizionalmente impiegato in protocolli di fecondazione sia sperimentalmente, sia nella pratica acquacolturale. Attualmente diverse metodologie sono utilizzate per la valutazione della motilità spermatica, dalla tradizionale analisi visuale al microscopio ottico, alla moderna analisi computerizzata mediante sofisticati sistemi di computazione dei movimenti spermatici.

Questo studio propone un modo pratico e efficiente per la valutazione della qualità del seme degli organismi acquatici attraverso l'analisi dei parametri fisiologici della motilità spermatica: 1- tempo di attivazione, 2- massima classe di motilità, 3- durata della massima classe di motilità e 4- durata totale della motilità spermatica. Questa metodologia è basata sulla tecnica classica di analisi visuale al microscopio ottico e non richiede l'utilizzo di strumenti sofisticati potendo essere realizzata in qualsiasi laboratorio.

I quattro parametri della motilità spermatica, tempo di attivazione, massima classe di motilità, durata della massima classe di motilità e durata totale della motilità spermatica, sono direttamente relazionate ai comparti cellulari responsabili per il movimento dello spermatozoo: la membrana plasmatica, le macromolecole contrattili, il metabolismo mitocondriale e il metabolismo generale.

Queste informazioni sulla motilità spermatica permettono applicazioni in differenti campi: dalla acquacoltura alle ricerche sull'ambiente.

La criobiologia è una scienza interdisciplinare che sta alla base di molte conoscenze ed applicazioni; la criobiologia acquatica si colloca in maniera interdisciplinare tra le scienze acquatiche, la biologia, le biotecnologie, l'ambiente e le produzioni agroalimentari come l'acquacoltura. La crioconservazione di gameti e di embrioni di organismi acquatici può essere utilizzata in vari campi di applicazione: processi di selezione per il miglioramento genetico delle specie acquatiche in allevamento; trasferimenti di specie con riduzione del rischio di trasmissione di infezioni; disponibilità continua di gameti per produzioni oltre le normali stagioni di riproduzione; supporto alle applicazioni dell'ingegneria genetica; saggi ecotossicologici; strategia criogenica per la difesa della biodiversità.

1 STATO DELL'ARTE

1.1 Motilità spermatica e criopreservazione

➤ Motilità spermatica

Lo sperma dei pesci teleostei e dei molluschi marini è diverso da quello dei mammiferi in due aspetti importanti: è immotile alla emissione e la motilità è indotta al contatto con l'acqua marina. Metodi di valutazione della qualità dello sperma di questi organismi devono tenere in considerazione questi fattori poiché i parametri misurati saranno influenzati dalla tecnica con cui viene indotta la motilità e dal periodo in cui dopo viene misurata (Kime et al., 2001).

I due parametri più evidenti che sono utili per valutare la qualità degli spermatozoi sono la motilità (movimento progressivo) e la durata del movimento. Nei mammiferi la velocità spermatica lineare è tra gli indicatori più affidabili della fertilità (Moore & Akhondi, 1996). Nei pesci e molluschi marini la traiettoria dello spermatozoi è generalmente più curvilinea rispetto ai mammiferi.

La metodologia più comunemente utilizzata per valutare la qualità dello sperma è stata quella di osservare lo sperma direttamente al microscopio sul vetrino o tramite videoregistrazione, e valutare il suo movimento in confronto ad una scala predeterminata (Guest et al., 1976; Billard et al., 1977; McMaster et al., 1992; Utsugi, 1993; Fabbrocini et al., 2000). Tali metodi possono dare una valutazione approssimativa della motilità spermatica ma poichè questi metodi sono suscettibili di trattamento statistico, se i punteggi sono realizzati con diversi osservatori indipendenti per ogni campione, possono in definitiva essere considerati affidabili.

Un importante passo avanti nella valutazione rapida e obiettiva della motilità spermatica è venuto dall'impiego di un sofisticato metodo di analisi di immagine per la valutazione spermatica dei mammiferi – *CASA: Computer Assisted Sperm Analysis*. Questa metodologia può essere applicata senza restrizione per organismi acquatici mediante alcuni adattamenti tecnici (Kime et al., 2001; Rurangawa et al., 2004).

Attualmente questa metodologia viene utilizzata anche per la valutazione della motilità spermatica di pesci teleostei (Dreanno et al., 1997; Dreanno et al., 1998; Fauvel et al., 1998; Abascal et al., 2007; Fabbrocini et al., 2012) e di alcuni molluschi marini (Lyons et al., 2005; Acosta-Salmón et al., 2007). Tuttavia l'analisi spermatica per mezzo del sistema CASA non è ancora ampiamente diffusa a causa dei costi elevati, e gran parte degli ricerche sulla motilità e criopreservazione sono ancora fatte mediante analisi visuale al microscopio ottico.

Per quanto riguarda la conoscenza della motilità spermatica degli organismi acquatici i dati disponibili in letteratura sono scarsi. La maggior parte si riferisce ai pesci di acqua dolce di acquacoltura soprattutto ciprinidi e salmonidi (Morisawa et al., 1983; Billard & Cosson, 1992; Rurangawa et al., 2004). Per i molluschi marini, limitate sono le ricerche direzionate specificamente alla motilità spermatica, la gran parte è associata alla criopreservazione spermatica e ai saggi ecotossicologici (Earnshaw et al., 1986; Gwo et al., 2002; Dong et al., 2005; Di Matteo et al., 2009; Vitiello et al., 2011).

➤ Criopreservazione

Secondo la Society for Cryobiology, società scientifica internazionale per la biologia e medicina delle basse temperature, la criobiologia comprende lo studio di materiale o sistemi biologici (proteine, cellule, tessuti ed organi) sottoposti a condizioni moderatamente ipotermiche, alle basse temperature ed alle temperature criogeniche (oltre -70°C).

La crioconservazione dei gameti è una tecnologia da lungo tempo utilizzata nell'ambito acquaculturale perché permette la creazione di banche di gameti che garantiscono una serie di vantaggi quali la disponibilità continua di gameti fuori delle stagioni normali di riproduzione, la possibilità di incrociare animali che presentano particolari caratteristiche genetiche, la creazione di linee selezionate per determinati caratteri e la limitazione del rischio di trasmissione di infezioni (Tsai & Lin, 2012). Inoltre, dal punto di vista ambientale, questa biotecnologia permette di creare un banco genetico per specie minacciate ed in via di estinzione (Holt, 1996; Fickel et al., 2007).

Per quanto riguarda la criopreservazione dei gameti, le prime sperimentazioni sono state svolte utilizzando il seme di rana e galline però senza avere risultati tangibili (Luyet & Hodapp, 1938; Shaffner et al., 1941). Tuttavia solamente nel 1949, i primi risultati concreti sono stati osservati sulla criopreservazione del seme di galline (Polge et al., 1949). Alcuni anni dopo è stato registrato il primo risultato effettivo utilizzando seme di pesci, quale l'aringa dell'Atlantico (Blaxter, 1953).

La tecnica di criopreservazione di gameti e di embrione dei pesci e invertebrati acquatici si viene sviluppando rapidamente negli ultimi anni, principalmente per la acquacoltura (Carolsfeld et al., 2003). Per alcune specie questa tecnologia è totalmente consolidata e diffusa in tutto il mondo. Un esempio classico è lo scambio di materiale genetico criopreservato dell'ostrica *Crassostrea gigas*, mollusco ampiamente allevato a livello mondiale (Chao & Liao, 2001; Guo, 2009).

Attualmente la criopreservazione di spermatozoi è stata sperimentata con successo per molti organismi acquatici e protocolli di criopreservazione su larga scala sono stati testati per specie d'acqua dolce e marine (Gwo, 2000; Suquet et al., 2000; Tiersch et al., 2007).

Nell'ambito dei molluschi marini studi per la messa a punto di protocolli di criopreservazione di seme sono stati svolti per un numero limitato di organismi quale l'ostrica giapponese *Crassostrea gigas* (Van der Horst et al., 1985; Bourgrier, 1986; Yankson & Moyse, 1991; Smith et al., 2001; Ieropoli et al., 2004; Adams et al., 2004; Dong et al., 2005; Dong et al., 2006), l'ostrica americana *Crassostrea virginica* (Zell et al., 1979; Paniagua-Chavez & Tiersh, 2001), le ostriche esotiche *Saccostrea cucullata*, *Crassostrea iredalei*, *Crassostrea tulipa* (Yankson & Moyse, 1991), l'ostrica piatta del Mediterraneo *Ostrea edulis* (Vitiello et al., 2011), le ostriche perlifere *Pinctada fucata martensii* (Kawamoto et al., 2007; Narita et al., 2008) e *Pinctada margaritifera* (Acosta-Salmon et al., 2007), la cozza mediterranea *Mytilus galloprovincialis* (Di Matteo et al., 2009), il mitilo australiano *Perna canaliculus* (Smith et al., 2012), le capesante *Argopecten purpuratus* (Dupré et al., 2004) e *Chlamys farreri* (Li et al., 2000) e le specie di abalone *Haliotis diversicolor supertexta* (Gwo et al., 2002) e *H. rufescens* (Salinas-Flores et al., 2005).

In Brasile studi relazionati alla criopreservazione del seme di molluschi marini sono scarsi e indicano l'esistenza di problemi nella standardizzazione della tecnica (Reis et al., 2003; Zeni et al., 2009a; Zeni et al., 2009b). In questo senso, studi di base per l'ottimizzazione dei protocolli ormai esistenti e l'esecuzione di nuovi protocolli applicati ai molluschi con potenziale zootecnico devono essere incentivati per garantire la produzione continua di seme e l'ampliamento della produzione commerciale di molluschi.

Per quanto riguarda i ricci di mare sono stati elaborati i protocolli per le specie *Strongylocentrotus drobachiensis* (Dunn & McLachlan, 1973), *S. intermedius* e *Hemicentrotus pulcherrimus* (Asahina

& Takahashi, 1979), *Pseudocentrotus depressus* (Kurokura et al., 1989), *Tetrapigus niger* e *Loxechinus albus* (Barros et al., 1997), e *Evechinus chloroticus* (Adams et al., 2004). Per il riccio mediterraneo *Paracentrotus lividus* ancora non è stato proposto un protocollo di criopreservazione del seme. Studi precedenti indicano che il seme di questa specie è molto sensibile al congelamento (Lombardi, 2006; Vitiello, 2011). Anche la criopreservabilità degli embrioni di questa specie non è stata standardizzata (Paredes & Bellas, 2009; Bellas & Paredes, 2011).

In ogni modo la crioconservazione di gameti, in particolare di specie marine, non è ancora diffusamente utilizzata, soprattutto perché mancano studi approfonditi sulle problematiche ad esso connesse (Gwo, 2000). Inoltre le caratteristiche fisiologiche degli spermatozoi di pesci e molluschi sono diverse da quelle presenti nei mammiferi per i quali la criopreservazione è stata abbastanza studiata e molti problemi superati (Chao & Liao, 2001). Dal punto di vista morfologico e fisiologico queste differenze non permettono la semplice riproduzione di protocolli già consolidati soprattutto perché i protocolli di criopreservazione sono generalmente specie-specifici (Holt, 2000a).

Le fasi di congelamento/scongelo provocano notevoli danni alle cellule (Adam et al., 1995; Holt, 2000b; Morris et al., 2012), soprattutto al livello della membrana plasmatica, la cui integrità è indispensabile per la corretta funzionalità cellulare; è dunque indispensabile, per l'applicazione di tali biotecnologie, studiare le varie fasi del processo di congelamento e del successivo scongelamento, come pure dei mezzi in cui i gameti sono diluiti durante queste fasi, in modo da ottenere allo scongelamento il ripristino, quanto più completo è possibile, della normalità fisiologica delle cellule integre crioconservate.

Per garantire il successo della criopreservazione è necessario ottimizzare tutte le fasi sperimentali, tra le quali è fondamentale la scelta dell'agente crioprotettivo (CPA). I CPA proteggono le cellule ed i tessuti nel processo di congelamento e scongelamento (Leung, 1991). Queste sostanze sono classificate basicamente in intracellulari e extracellulari. I CPA intracellulari sono soluti organici responsabili per la protezione del compartimento intracellulare durante il congelamento. Presentano basso peso molecolare e grande capacità di penetrazione nella membrana plasmatica. I CPA extracellulari sono macromolecole non permeabili la cui funzione è ridurre la formazione dei cristalli di ghiaccio, sostenendo la disidratazione cellulare e proteggere la membrana plasmatica. Le sostanze più utilizzate sono saccarosio, glucosio, lattosio, trealosio, polivinilpirrolidone (PVP) e mannitolo (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

Sostanze come il dimetilsolfossido (DMSO), glicerolo (GLY), propilen glicole (PG), etilen glicole (EG) e metanolo (MET) sono generalmente impiegate come agente crioprotettivi intracellulari nel congelamento dei gameti, tuttavia presentano effetti tossici per le cellule (Arakawa et al., 1990). Negli studi tesi all'ottimizzazione di protocolli di criopreservazione spermatica inizialmente il piano sperimentale viene organizzato per individuare la tossicità degli agenti crioprotettivi. In generale i CPA che presentano una rapida permeabilità sono più favoriti perché richiedono un tempo minore di adattamento prima del congelamento, quindi il seme viene esposto per meno tempo agli effetti dannosi dell'agente crioprotettivo (Kasai et al., 1996).

Allo stesso modo l'aggiunta di soluzione diluente è fondamentale per fornire un ambiente osmotico e nutrizionale per gli spermatozoi durante il processo di congelamento e scongelamento. La diluizione del seme in un mezzo idoneo, in molte specie ittiche aumenta la capacità fecondante (Tambasen-Cheong et al., 1995; Ohta & Izawa, 1996); inoltre, aiuta a stabilizzare i parametri chimico-fisici (Tan-Fermin et al., 1999) e a volte è in grado di indurre l'inibizione della motilità spermatica, impedendo lo spreco delle riserve energetiche degli spermatozoi (Chambeyron & Zohar, 1990; Villani & Catena, 1991; Barbato et al., 1998; Sansone et al., 2001).

Altro fattore essenziale per l'ottenimento, allo scongelamento di spermatozoi di buona qualità è la velocità di raffreddamento e congelamento e le modalità di adattamento all'extender: procedure

troppo lente, infatti, implicano una lunga esposizione delle cellule ad alte concentrazioni di CPA, variazioni di pH, precipitazioni di soluti (Fiser et al., 1993); tempi di raffreddamento e congelamento eccessivamente brevi hanno però come inconveniente la formazione incontrollata di cristalli di ghiaccio che possono provocare danni alla membrana plasmatica, alterando la funzionalità cellulare (Mazur, 1984; De Leeuw et al., 1990; Holt, 2000b; Morris et al., 2012).

1.2 Utilizzo di seme criopreservato in saggi ecotossicologici

La metodologia tradizionalmente utilizzata per la valutazione della contaminazione ambientale consiste nella ricerca diretta degli inquinanti mediante analisi chimico-fisiche. Le informazioni ottenibili in questo modo presentano però delle carenze, in quanto non permettono di registrare le tracce di episodi di degrado avvenuti precedentemente e, soprattutto, non danno una stima reale delle loro azioni tossiche sugli organismi viventi, che sono il risultato, innanzitutto, di effetti dei vari inquinanti (Chapman, 2002; Chapman et al., 2002; Davoren et al., 2005).

Qualsiasi sia il fine che spinge alla sorveglianza ed alla tutela di un determinato ambiente, è necessario l'utilizzo di adeguate metodologie di monitoraggio ambientale e di una corretta strategia di applicazione di queste metodologie (Burton Jr, 1999; Chapman, 2008; D'Adamo et al., 2008).

I saggi di tossicità rappresentano un utile strumento per l'identificazione precoce di situazioni di rischio per il biota, in quanto permettono di evidenziare gli effetti causati dall'insieme degli inquinanti biodisponibili nell'area considerata mediante misure replicate, in specie target scelte in base all'importanza che rivestono nell'ecosistema considerato e/o in base alla loro sensibilità (Nipper et al., 1993; Nascimento et al., 2000).

I saggi di tossicità, infatti, permettono una rapida valutazione della frazione biodisponibile di inquinanti, anche a basse concentrazioni, tenendo conto nel contempo anche degli effetti additivi, sinergici e/o antagonisti di tutte le componenti che interagiscono con il biota (Nipper et al., 1993; Fabbrocini et al., 2005; Macken et al., 2009; Narracci et al., 2009).

La scelta degli organismi (indicatori biologici) più idonei per un saggio di tossicità deve tenere conto di numerosi fattori, tra cui sensibilità e affidabilità, distribuzione e rilevanza ecologica della specie, disponibilità nell'arco dell'anno. Inoltre, un saggio ecotossicologico deve prevedere "endpoints" che possano essere misurati in maniera il più possibile riproducibile, oggettiva, accurata e rapida (Chapman 2002; Chapman et al., 2002).

La capacità riproduttiva costituisce un indicatore sensibile per la sopravvivenza di una specie e può quindi risultare anche un utile parametro per valutare il rischio ambientale indotto da fenomeni di contaminazione chimica. In effetti, grazie alla loro elevate sensibilità, gameti ed embrioni di organismi acquatici sono comunemente utilizzati nei test ecotossicologici (Pagano et al., 1986; His et al., 1999; Au et al., 2000; Lam et al., 2000; Bellas et al., 2001; Micheletti et al., 2004; Raisuddin et al., 2007; Masullo et al., 2008; Embry et al., 2010) e per valutare la qualità biologica delle acque e dei sedimenti in aree soggette ad effetti antropici (Beiras et al., 2003; Volpi Ghirardini et al., 2005; Saco-Álvarez et al., 2010). Gli effetti di molte sostanze tossiche sulla motilità spermatica e sulla capacità di fecondazione e sviluppo larvale sono stati studiati in differenti specie (Pagano et al., 1993; Warnau et al., 1996; Yokota et al., 2001; Arizzi Novelli et al., 2003; Abascal et al., 2007; Losso et al., 2007; Beiras & Bellas, 2008; Filosto et al., 2008).

Studi di spermiotossicità sono stati ampiamente effettuati su numerosi sistemi biologici, confermando l'elevata sensibilità ai contaminanti testati degli spermatozoi di differenti specie acquatiche (Kime et al., 1996; Rurangwa et al., 2002; Rosety et al., 2003; Lahnsteiner et al., 2004; Lera et al., 2006; Gopalakrishnan et al., 2008).

Tra i fattori che favoriscono l'utilizzo degli spermatozoi nelle indagini ecotossicologiche vi è la rapidità delle procedure di esposizione e valutazione: tipicamente, infatti, nei saggi di spermiotossicità, la tossicità di un inquinante è valutata esponendo lo sperma per un breve periodo di tempo (30-60 minuti), al termine del quale, l'utilizzo del parametro motilità spermatica fornisce una risposta immediata all'esposizione del contaminante.

L'applicazione delle tecniche di analisi computerizzata della motilità spermatica alle specie acquatiche ne ha reso possibile una valutazione rapida, quantitativa ed oggettiva, che fornisce inoltre in tempo reale informazioni su parametri quali la velocità lineare e curvilinea o la frequenza del battito flagellare, che non sono osservabili manualmente, ma che sono stati positivamente correlati alla capacità fecondante (Brokaw, 1985; Kime et al., 1996; Kime et al., 1999; Au et al., 2000; Au et al., 2001; Kime et al., 2001; Au et al., 2002; Cosson, 2004; Liu et al., 2007).

Inoltre, la possibilità di predire la capacità fecondante di un campione di seme mediante analisi computerizzata della motilità non dipende dalla qualità delle uova o da altri fattori che possono influenzare le fasi di fecondazione e sviluppo larvale, riducendo così notevolmente il numero di variabili, rispetto ad un test ecotossicologico tradizionale (Au et al., 2000; Au et al., 2001; Au et al., 2002).

Nella messa a punto di un protocollo sperimentale che possa fungere da saggio ecotossicologico facilmente applicabile e ripetibile è necessario valutare, non solo l'effettivo grado di sensibilità ai diversi contaminanti del sistema biologico preso in esame, ma anche la disponibilità di tale sistema per l'esecuzione di saggi lungo tutto l'arco dell'anno.

Una ulteriore problematica che si pone quando si affronta il problema della messa a punto di test tossicologico è legata alla stagionalità dei cicli riproduttivi e quindi alla disponibilità dei sistemi biologici (gameti ed embrioni di specie acquatiche sentinella); tale difficoltà può essere ovviata utilizzando le tecnologie criobiologiche: lo stoccaggio in azoto liquido rende i sistemi biologici bioindicatori disponibili in qualsiasi periodo dell'anno per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici, con indubbio potenziamento dei controlli ambientali grazie alla possibilità di effettuare azioni di biomonitoraggio in continuo e con maggiore omogeneità di standard qualitativo, rendendo più affidabili e riproducibili i saggi (Benhra et al., 1997; Paredes & Belas, 2009).

Inoltre nelle sperimentazioni di criopreservazione la motilità degli spermatozoi di vari organismi acquatici hanno mostrato una buona correlazione tra effetti delle sostanze crioprotettive che sono sostanze xenobiotiche e parametri fisiologici che caratterizzano la motilità, come capacità di attivazione, velocità, durata, percentuali di spermatozoi (RVL) rapidi, vigorosi e lineari caratterizzati dal migliore pattern di motilità (Fabbrocini et al., 2000) e capacità fecondante.

Pertanto i sistemi criopreservati possono essere considerati dei buoni indicatori biologici da utilizzare per effettuare saggi ecotossicologici rispondendo a tutti i requisiti richiesti: disponibilità continua; correlazione effetti xenobiotici-rischio ambientale; omogeneità di campioni utilizzabili; test rapidi, semplici e riproducibili.

Gli spermatozoi di sparidi, come quelli di *Sparus aurata*, sono fisiologicamente inattivi in relativa bassa osmolarità, ciò li rende adattabili a differenti ambienti acquatici. La orata *S. aurata*, specie ampiamente allevata, offre la possibilità di avere una continua ed elevata disponibilità di spermatozoi grazie a metodi standardizzati di crioconservazione dello sperma di tale teleosteo (Fabbrocini et al., 2000), per l'effettuazione di test ecotossicologici affidabili e riproducibili.

1.3 Bibliografia

- Abascal FJ, Cosson J, Fauvel C (2007) Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *J Fish Biol* 70:509-522.
- Acosta-Salmón H, Jerry DJ, Southgate PC (2007) Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L) spermatozoa. *Cryobiology* 54:13-18.
- Adam MM, Rana KJ, McAndrew BJ (1995) Effect of cryoprotectants on activity of selected enzymes in fish embryos. *Cryobiology* 32:92-104.
- Adams SL, Hessian PA, Mladenov PV (2004) Cryopreservation of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) sperm. *Cryo Letters* 25:287-299.
- Arakawa T, Carpenter JF, Kita YA, Crowe JH (1990) The Basis for Toxicity of Certain Cryoprotectants: A Hypothesis. *Cryobiology* 27:401-415.
- Arizzi Novelli A, Losso C, Ghetti PF, Volpi Ghirardini A (2003) Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): Comparison with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environ Toxicol Chem* 22:1295-1301.
- Asahina E, Takahashi T (1979) Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm. *Develop Growth and Differ* 21:423-430.
- Au DWT, Chiang MWL, Wu RSS (2000) Effect of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. *Arch Environ Contam Toxicol* 38:455-463.
- Au DWT, Lee CY, Chan KL, Wu RSS (2001) Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality. *Environ Pollut* 111:1-9.
- Au DWT, Chiang MWL, Tang JYM, Yuen BBH, Wang YL, Wu RSS (2002) Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: predicting fertilization success from sperm motility. *Mar Pollut Bull* 44:583-589.
- Barbato F, Canese S, Moretti F, Misiti S (1998) Sviluppo di metodiche affidabili per la criopreservazione dello sperma di teleostei marini di interesse economico. *Biol Mar Mediterr* 5:894-90.

- Barros C, Muller A, Wood MJ (1997) High survival of spermatozoa and pluteus larvae of sea urchins frozen in Me₂SO. *Cryobiology* 35:341.
- Beiras R, Bellas J, Fernández N, Lorenzo JJ, Cobelo-García A (2003) Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Mar Environ Res* 56:531-53.
- Beiras R, Bellas J (2008) Inhibition of embryo development of the *Mytilus galloprovincialis* marine mussel by organic pollutants; assessment of risk for its extensive culture in the Galician Rias. *Aquaculture* 277:208-212.
- Bellas J, Vázquez E, Beiras R (2001) Toxicity of Hg, Cu, Cd and Cr early development al stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. *Wat Res* 35:2905-2912.
- Bellas J, Paredes S (2011) Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: Potential application in marine water quality assessment. *Cryobiology* 62:174-180.
- Benhra A, Radetski C, Féraud JF (1997) Cryoalgotox: use of cryopreserved algae in a semistatic microplate test. *Environ Toxicol Chem* 163:505-508
- Billard R, Dupont J, Barnabe G (1977) Fall in motility and survival time at low temperature of sperm of *Dicentrarchus labrax* L. (Pisces, Teleostei) during the spawning season. *Aquaculture* 11:363-367.
- Billard R, Cosson MP (1992) Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool* 261:122-131.
- Blaxter JHS (1953) Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172:1189-1190.
- Bougrier S, Rabenomanana LD (1986) Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 58:277-280.
- Brokaw CJ (1985) Computer simulation of flagellar movement. VI. Simple curvature controlled models are incompletely specified. *Biophys J* 48:633-642.
- Burton Jr GA (1999) Realistic assessments of ecotoxicity using traditional and novel approaches. *Aquat Ecosyst Health* 2:1-8.

- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol* 63:472-489.
- Chambeyron F, Zohar Y (1990) A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90:345-352.
- Chao NH, Liao IC (2001) Criopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197:161-189.
- Chapman PM (2002) Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull* 44:7-15.
- Chapman PM, Ho KT, Munns Jr WR, Solomon K, Weinstein MP (2002) Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar Pollut Bull* 44:271-278.
- Chapman PM (2008) Determining ecological relevance from ecotoxicological studies. Avoiding common pitfalls. In: Giornate di studio ICRAM “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti marini e salmastri”. Viareggio (LU), 25-26 novembre 2008
- Cosson J (2004) The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa. *Aquacult Int* 12:69-85.
- D’Adamo R, Di Stasio M, Fabbrocini A, Petitto F, Roselli L, Volpe MG (2008) Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environ Monit Assess* 143:15-24.
- Davoren M, Shùilleabhain SN, O’Halloran J, Hartl MGJ, Sheenan D, O’Brien NM, Van Pelt FNAME, Mothershill C (2005) A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology* 14:741-755.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ (1990) Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27:171-183.
- Denniston R, Michelet S, Godke RA. Principles of cryopreservation. In *Cryopreservation in aquatic species*, Tiersch TR & Mazik PM, eds, World Aquaculture Society, 2000, pp.59-74.
- Di Matteo O, Langellotti AL, Masullo P, Sansone G (2009) Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology* 58:145-150.
- Dong Q, Eudeline B, Huang C, Allen Jr. SK, Tiersch TR (2005) Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology* 50:1-16.

- Dong Q, Huang C, Eudeline B, Allen Jr. SK, Tiersch TR (2006) Systematic factor optimization for sperm cryopreservation of tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Theriogenology* 66:387-403.
- Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, Normant Y, Billard R (1997) Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology* 48:589-603.
- Dreanno C, Suquet M, Desbruyeres E, Cosson J, Delliou H, Billard R (1998) Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 169:247-262.
- Dunn RS, McLachlan J (1973) Cryopreservation of echinoderm sperm. *Can J Zool* 51:666-669.
- Dupré E, Espinoza C (2004) Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Invest Mar Valparaíso* 32:3-9.
- Earnshaw MJ, Wilson S, Akberali HB, Butler RD, Marriott KRM (1986) The actions of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) III. The effect of applied copper and zinc on sperm motility in relation to ultrastructure damage and intracellular metal localisation. *Mar Environ Res* 20:261-278.
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard MA, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97:79-87.
- Fabbrocini A, Lubrano Lavadera S, Rispoli S, Sansone G (2000) Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40:46-53.
- Fabbrocini A, Guarino A, Scirocco T, Franchi M, D'Adamo R (2005) Integrated biomonitoring assessment of the Lesina Lagoon (Southern Adriatic Coast, Italy): preliminary results. *Chem Ecol* 21:479-489.
- Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Rinna F, Silvestri F, Sorrenti G, Vitiello V, Sansone G (2012) Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotox Environ Safe* 84:293-298.
- Fauvel C, Savoye O, Dreanno C, Cosson J, Suquet M (1998) Characteristics of sperm of captive seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to its fertilisation potential. *J Fish Biol* 54:356-369.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A (2007) Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wild Res* 53:81-89.

- Filosto S, Roccheri MC, Bonaventura R, Matranga V (2008) Environmentally relevant cadmium concentrations affect development and induce apoptosis of *Paracentrotus lividus* larvae cultured in vitro. *Cell Biol Toxicol* 24:603-610.
- Fiser PS, Fairfull RW, Hansen C, Panich PL, Shresta J, Underhill L (1993) The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol Reprod Dev* 34:190-195.
- Gopalakrishnan S, Thilagam H, Vivek Raja P (2008) Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermatoxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*. *Chemosphere* 71:515-528.
- Guest WC, Avault Jr. JW, Roussel JD (1976) Preservation of channel catfish sperm. *Trans Am Fish Soc* 105:469-474.
- Guo X (2009) Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture. *Rev Aquaculture* 1:251-259.
- Gwo JC (2000) Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquacult Res* 33:259-271.
- Gwo JC, Chen CW, Cheng HY (2002) Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology* 58:1563-1578.
- His E, Beiras R, Seaman M (1999) The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Adv Mar Biol* 37:1-178.
- Holt WV, Bennett PM, Volobouev V, Watson PF (1996) Genetic resource banks in wildlife conservation. *J Zool* 238:531-544.
- Holt WV (2000a) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.
- Holt WV (2000b) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
- Ieropoli S, P Masullo, M Do Espirito Santo, G Sansone (2004) Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49:250-257.
- Kawamoto T, Narita T, Isowa K, Aoki H, Hayashi M, Komaru A, Ohta H (2007) Effects of Cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 5:19-26.

- Kasai M (1996) Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci* 42:67-75.
- Kime DE, Hebraimi M, Nysten K, Roelants I, Rurangwa E, More HDM, Ollevier F (1996) Use of computer assisted sperm analysis for monitoring the effect of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metal. *Aquat Toxicol* 36:223-237.
- Kime DE, Nash JP, Scott AP (1999) Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177:345-352.
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F (2001) Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem and Physiol - C* 130:425-433.
- Kurokura H, Yagi N, Hirano R (1989) Studies on cryopreservation of sea urchin sperm. *Suisanzoshoku* 37:215-219.
- Lahnsteiner F, Mansour N, Berger B (2004) The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *J Fish Biol* 65:1283-1297.
- Lam PKS, Wo KT, Wu RSS (2000) Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Environ Toxicol* 15:8-13.
- Lera S, Macchia S, Pellegrini D (2006) Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ Monit Assess* 122:101-109.
- Leung LKP, Principles of biological cryopreservation. In *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*, Jamieson BGM, ed., Cambridge University Press, 1991, pp. 231-244.
- Li C, Li J, Xue QZ (2000) Cryopreservation of the spermatozoa of *Chlamys (Azumapecten) farreri*, *Progress in Fishery Sciences* 2:57-62.
- Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Ding FH, Yu DD, Xu XZ (2007) Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 263:20-25.
- Lombardi, E. Criobiologia di Spermatozoi di *Paracentrotus lividus*. Tesi di Laurea Sperimentale in Fisiologia dello Stress in Ambiente Acquatico. Università degli Studi di Napoli Federico II, Facoltà di Scienze MM. FF. NN., 2006
- Losso C, Picone M, Arizzi Novelli A, Delaney E, Ghetti PF, Volpi Ghirardini A (2007) Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus*

lividus, the oyster *Crassostrea gigas* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Contam Toxicol 53:220-226.

Luyet BJ, Hodapp EL (1938) Revival of Frog's Spermatozoa Vitriified in Liquid Air. Exp Biol Med 39:433-434.

Lyons KG, Brigham CA, Traut BH, Schwartz MW (2005) Rare Species and Ecosystem Functioning. Conserv Biol 19:1019-1024.

Macken A, Giltrap M, Ryall K, Foley B, McGovern E, McHugh B, Davoren M (2009) A test battery approach to the ecotoxicological evaluation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. Ecotoxicology 18:470-480.

Masullo P, Attianese M, Del Prete F, Langellotti AL, Sansone G (2008) Effetti di sostanze xenobiotiche (metalli pesanti) singole ed in miscela sulla sopravvivenza di embrioni di *Sparus aurata*. Biol Mar Med 15:166-167.

Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 247:125-142.

McMaster ME, Portt CB, Munkittrick KR, Dixon DG (1992) Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. Ecotox Environ Safe 23:103-117.

Micheletti C, Critto A, Carlon C, Marcomini A (2004) Ecological risk assessment of persistent toxic substances for the clam *Tapes philipinarum* in the Lagoon of Venice, Italy. Environ Toxicol Chem 23:1575-1582.

Moore HD, Akhondi MA (1996) Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. J Androl 17:50-60.

Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Mosisawa S, Yasuda K (1983) Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. J Exp Biol 107:95-103.

Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F (2012) Freezing injury: The special case of the sperm cell. Cryobiology 64:71-80.

Narita T, Kawamoto T, Isowa K, Aoki H, Hayashi M, Komaru A, Ohta H (2008) Fertility of cryopreseved spermatozoa of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Aquaculture 275:178-181.

- Narracci M, Cavallo RA, Acquaviva MI, Prato E, Biandolino F (2009) A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Environ Monit Assess* 148:307-314.
- Nascimento AI, Smith DH, Pereira SA, Sampaio de Araujo MM, Silva MA (2000) Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. *Aquat Ecosyst Health* 3:449-458.
- Niemann H (1991) Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
- Nipper M, Prosperi VA, Zamboni AJ (1993) Toxicity testing with coastal species of Southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull Environ Contam Toxicol* 50:646-652.
- Ohta H, Izawa T (1996) Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142:107-118.
- Pagano G, Cipollaro M, Corsale G, Esposito A, Ragucci E, Giordano GG, Trieff NM. The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In *Community Toxicity Testing STP 920*, Cairns Jr J, ed., ASTM 1986, pp. 66-92.
- Pagano G, Anselmi B, Dinnel PA, Esposito A, Guida M, Iaccarino M, Melluso G, Pascale M, Trieff NM (1993) Effects on sea urchin fertilization and embryogenesis of water and sediment from two rivers in Campania, Italy. *Arch Environ Contam Toxicol* 25:20-26.
- Paniagua-Chavez CG, Tiersch TR (2001) Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology* 43:211-223.
- Paredes S, Bellas J (2009) Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. *Cryobiology* 59:344-350.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666-667.
- Raisuddin S, Kwok KWH, Leung KMY, Schlenk D, Lee JS (2007) The copepod Tigriopus: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat Toxicol* 83:161-173.
- Reis ACP, Pauls E, Cabezas CMV, Castro MAL. Preliminary studies in cryopreservation of spermatozoa of *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758), a native scallop from Brazil. *Book of Abstracts: World Aquaculture 2003*, Salvador, Brazil, 2003, p. 584.

- Rosety M, Ordoñez FJ, Rosety-Rodríguez M, Rosety JM, Rosety I (2003) In vitro acute toxicity of anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the motility of gilthead (*Sparus aurata*, L.) sperm. *Histol Histopathol* 18:475-478.
- Rurangwa E, Biegniowska A, Slominska E, Skorkowski EF, Ollevier F (2002) Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comp Biochem Physiol - C* 131:335-344.
- Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234:1-28.
- Saco-Álvarez L, Durán I, Lorenzo JJ, Beiras R (2010) Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotox Environ Safe* 73:491-499.
- Salinas-Flores L, Paniagua-Chavez CG, Jenkins JA, Tiersch TR (2005) Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *J Shellfish Res* 24:415-420.
- Sansone G, Fabbrocini A, Zupa A, Lavadera SL, Rispoli S, Matassino D (2001) Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa motility. *Aquaculture* 202:257-268.
- Shaffner CS, Henderson EW, Card CG (1941) Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poult Sci* 20:259.
- Smith JF, Pugh PA, Tervit HR, Roberts RD, Janke AR, Kaspar HF, Adams SL (2001) Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos. *Proc N Z Soc Anim Prod* 61:31-34.
- Smith JF, Adams SL, Gale SL, McGowan LT, Tervit HR, Roberts RD (2012) Cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) sperm. I. Establishment of freezing protocol. *Aquaculture* 337:199-204.
- Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R (2000) Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult Res* 31:231-243.
- Tan-Fermin JD, Miura T, Adachi S, Yamauchi K (1999) Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture* 171:323-338.
- Tambasen-Cheong MVP, Tan-Fermin JD, Garcia LMB, Baldevarona RB (1995) Milt-egg ratio in artificial fertilization of the Asian freshwater catfish, *Clarias macrocephalus*, injected salmon gonadotropin-releasing hormone analogue and domperidone. *Aquat Living Resour* 8:303-307.

- Tiersch TR, Yang H, Jenkins JA, Dong Q (2007) Sperm cryopreservation in fish and shellfish. Soc Reprod Fertil Suppl 65:493-508.
- Tsai S, Lin C (2012) Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. Braz Arch Biol Technol 55:425-433.
- Utsugi K (1993) Motility and morphology of sperm of the ayu, *Plecoglossus altivelis*, at different salinities. Jpn J Ichthyol 40:273-278.
- Van der Horst G, Dott HM, Samuels JE, Genade A (1985) Short-term and long-term storage of viable oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. S Afr J Sci 81:404-405.
- Villani P, Catena C (1991) Criopreservazione di gameti maschili di spigola (*D. labrax*). Soluzioni e metodologie. Riv Ital Acquacoltura 26:217-222.
- Vitiello V, Carlino PA, Del Prete F, Langellotti AL, Sansone G (2011) Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing. Cryobiology 63:118-124.
- Vitiello, V. Applicazioni criobiologiche in acquacoltura e nella gestione delle risorse idrobiologiche. Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2011
- Volpi Ghirardini A, Losso C, Arizzi Novelli A, Baù A, His E, Ghetti PF (2005) *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). Chem Ecol 21:455-463.
- Warnau M, Iaccarino M, de Biase A, Tempra A, Jangoux M, Dubois P, Pagano G (1996) Spermotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *P. lividus*. Environ Toxicol Chem 15:1931-1936.
- Yankson K, Moyse J (1991) Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters. Aquaculture 97:259-267.
- Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T, Kobayashi K (2001) Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). Environ Toxicol Chem 20:2552-2560.
- Zell SR, Bamford MH, Hidu H (1979) Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster (*Crassostrea virginica*). Cryobiology 16:448-460.

Zeni TO, Moraes D, Sotelo DP, Serafim-Junior M, Pauls E. Avaliação do efeito tóxico de diferentes crioprotetores sobre espermatozóides de ostras do gênero *Crassostrea*. Anais do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, Brasil, 2009a.

Zeni TO, Sotelo DP, Pauls E, Serafim-Junior M. Efeito tóxico de dilmetil sulfóxido na criopreservação de gametas e embriões de *Nodipecten nodosus* (Mollusca, Pectinidae). Anais do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia. Rio de Janeiro: Brasil 2009b.

2 SCOPO DELLA RICERCA

&

PIANO SPERIMENTALE

2.1 Scopo della ricerca

Tale lavoro sperimentale è stato finalizzato ad applicazioni in ambito acquatico, basato sulla acquisizione di conoscenze sui parametri fisiologici della motilità spermatica, e sulla ottimizzazione e progettazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie acquacolturali e acquacolturabili.

Per raggiungere lo scopo della ricerca sono stati condotti una serie di esperimenti tesi alla determinazione dei parametri fisiologici di motilità spermatica: 1- tempo di attivazione, 2- massima classe di motilità, 3- durata della massima classe di motilità e 4- durata totale della motilità spermatica e per la messa a punto di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie autoctone ed alloctone allevate in Italia e di specie autoctone del litorale brasiliano rappresentative nel settore acquacolturale.

Inoltre, la presente ricerca ha mirato all'ottimizzazione del biosaggio ecotossicologico con spermatozoi criopreservati di Orata *Spaurus aurata* per la valutazione di ambienti acquatici diversi (marini, di transizione e di acqua dolce), mettendo a punto la esecuzione di un test semplice, universale, affidabile e ripetibile; nonchè alla progettazione di nuovi saggi con seme di molluschi marini per il monitoraggio ambientale degli ecosistemi marino costieri.

2.2 Piano sperimentale

Il progetto di tesi è stato sviluppato in tre fasi sperimentali, che hanno riguardato distinti aspetti della ricerca: motilità spermatica, criopreservazione e saggi ecotossicologici.

➤ **Acquisizione conoscenza sulla motilità spermatica**

Questa fase sperimentale ha avuto come oggetto di studio l'acquisizione di conoscenza della motilità spermatica di specie autoctone mediterranee (*Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus* e *Tapes decussatus*), di specie alloctone allevate in Italia (*Crasostrea gigas* e *Tapes philippinarum*) e delle specie autoctone del litorale brasiliano (*Perna perna*, *Crassostrea brasiliana* (=gasar), *Crassostrea rhizophorae* e *Nodipecten nodosus*).

Per ogni specie è stata valutata la motilità spermatica mediante determinazione dei parametri fisiologici di tale funzionalità: tempo di attivazione, massima classe di motilità, durata della massima classe di motilità e durata totale della motilità spermatica.

Per alcune specie sono state fatte prove preliminari sulle modalità di prelievo del seme e sugli effetti dei parametri ambientali e della conservazione e del trasporto del seme sulla motilità spermatica.

➤ **Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie acquacolturali**

In questa fase sono stati sperimentati i protocolli di criopreservazione del seme delle specie *Paracentrotus lividus* e *Nodipecten nodosus*, sistemi biologici per i quali tali protocolli di criopreservazione sono stati previamente testati, ma non hanno ancora raggiunto risultati significativi e il seme di *Perna perna* e *Crassostrea brasiliana* (=gasar) specie per le quali non sono disponibili protocolli specifici.

Per ognuno di tali sistemi biologici la sperimentazione è stata svolta secondo la classica articolazione dello studio criobiologico per la messa a punto di un protocollo di criopreservazione: acquisizione delle conoscenze sul sistema biologico per la gestione degli esperimenti, selezione degli agenti crioprotettivi meno tossici, selezione dei gradienti di adattamento/raffreddamento precongelo, selezione delle curve di congelamento/scongelo e ottimizzazione del protocollo.

➤ Ottimizzazione e progettazione di biosaggi con spermatozoi criopreservati

Questo aspetto della ricerca prevede l'articolazione in due fasi distinte: 1) l'ottimizzazione del saggio con seme criopreservato di orata *Sparus aurata*, 2) la progettazione di nuovi saggi con seme di molluschi marini.

Il protocollo sperimentale messo a punto con spermatozoi criopreservati di *Sparus aurata* proposto da Vitiello (2011) è stato ottimizzato esponendo il sistema criopreservato e scongelato a matrice ambientale di origini diverse (marini, di transizione e di acqua dolce). E' stata valutata la sensibilità del biosaggio in funzione delle valutazioni dei quattro parametri fisiologici della motilità spermatica rispetto al controllo.

Nella seconda fase è stata prevista l'individuazione di specie di molluschi marini il cui seme è potenzialmente utilizzabile in saggi di spermiotossicità, vale a dire quelli che presentano l'andamento della motilità spermatica applicabili alle caratteristiche necessarie per la realizzazione del test per tale scopo, l'andamento della motilità spermatica di ogni mollusco è stato analizzato e confrontato con quello di *Paracentrotus lividus*, organismo modello per questo tipo di saggio.

In tutte le fasi sperimentali ogni esperimento è stato ripetuto 3 volte, è ciascuna ripetizione è stata effettuata in triplicato ($n \geq 9$). L'analisi statistica è stata condotta effettuando il Test t di Student per evidenziare la significatività. Il valore $p < 0,05$ è stato individuato come livello soglia per la significatività.

3 RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 Acquisizione conoscenza sulla motilità spermatica

3.2 Materiali e Metodi

In questa fase sperimentale sono stati esaminati i parametri fisiologici della motilità spermatica di alcuni organismi marini utilizzati in acquacoltura tra le specie autoctone mediterranee, le specie alloctone allevate in Italia e le specie autoctone brasiliane.

La valutazione qualitativa degli spermatozoi è stata effettuata analizzando la motilità spermatica, espressa in classi (da 0 a 5), in base alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL), secondo la correlazione proposta da Fabbrocini et al. (2000).

Tabella I. Classi di motilità in relazione alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (Fabbrocini et al., 2000).

| Spermatozoi RVL (%) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 50 | 65 | 80 | 90 | 100 |
|---------------------|---|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|
| Classe di motilità | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |

3.2.1 Le specie mediterranee

➤ *Mytilus galloprovincialis*

Per la sperimentazione è stato utilizzato seme di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media 60 ± 5 mm), dall'azienda IRSVEM s.r.l. (Bacoli, NA). Gli animali erano provenienti da allevamenti commerciali della regione Campania senza essere depurati per evitare l'emissione di gameti (Figura 1).

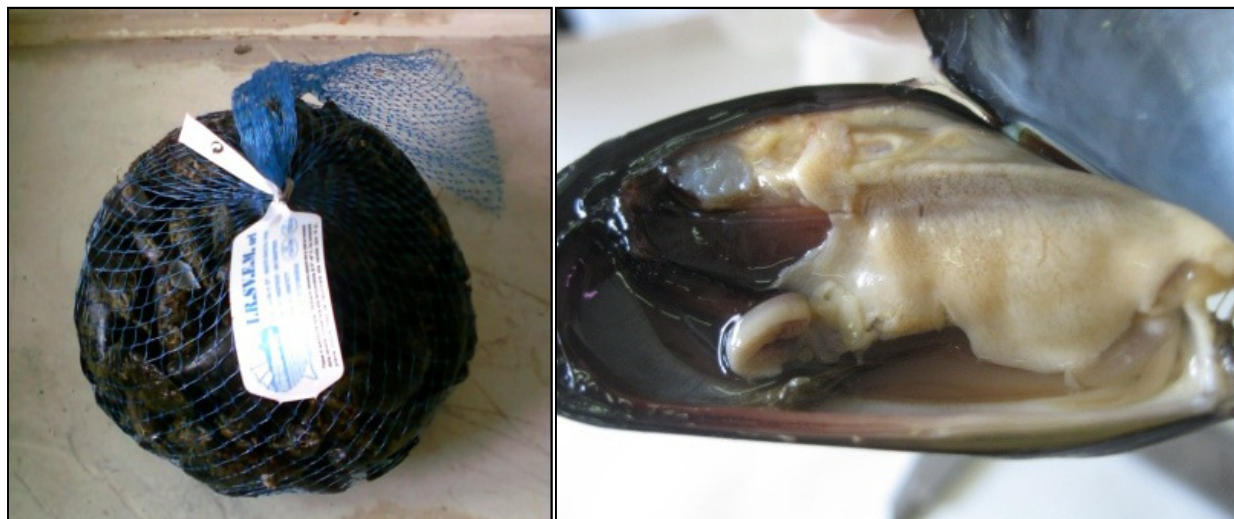


Figura 1. Aspetto generale dei molluschi ottenuti dalla IRSVEM s.r.l. e il dettaglio delle gonadi del maschio.

Il trasporto degli animali fino al laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo, mantenuto ad una temperatura di 5°C mediante l'uso di ghiaccio. Nel laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati e ne sono stati asportati gli organismi incrostanti.

Ottenimento seme

Prelievo bioptico

Il seme è stato ottenuto mediante prelievo bioptico introducendo un pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 20 µm per allontanare residui di tessuto gonadale. Una aliquota di ogni campione è stata attivata in acqua di mare filtrata a temperatura ambiente (1:1000 V/V) per la valutazione della qualità dello sperma. La motilità è stata valutata al microscopio ottico (x200) e i campioni con motilità maggiore di classe 3 sono stati utilizzati per la formazione dei pools. La classe di motilità è stata valutata secondo Fabbrocini et al. (2000).

Emissione gametica

Il seme è stato ottenuto sottoponendo gli organismi a shock termico e raccolto dai mitili singolarmente al fine di selezionare le emissioni di migliore qualità con cui costituire i pool di spermatozoi utilizzati per la sperimentazione.

I molluschi sono stati ricoperti con acqua di mare filtrata sterilizzata (0,45 µm) a 18°C con ricambi periodici dell'acqua sotto a sequenziale shock termici da 4-5°C (Di Matteo et al., 2009). All'inizio dell'emissione gli individui venivano separati e posti in recipienti singolarmente per il completamento dell'emissione. Dopo l'emissione, la sospensione spermatica è stata filtrata 20 µm e la motilità valutata al microscopio ottico (x200) per la formazione dei pools.

Effetto del prelievo bioptico e dell'emissione sulla motilità spermatica

In questa prova è stato valutato l'andamento della motilità spermatica nel tempo dello sperma ottenuto da prelievo bioptico e di quello emesso mediante induzione per shock termico. Per ogni esperimento sono stati utilizzati molluschi maturi per ogni tipologia di prelievo (bioptico/emissione) e formati pools con almeno tre migliori individui (motilità maggiore della classe 3,0).

Il seme ottenuto da prelievo bioptico è stato attivato mediante diluizione 1:1000 con acqua di mare filtrata (0,45µm) e mantenuto a temperatura ambiente (18 ±1°C), salinità 36%, pH 8,0-8,5 monitorando l'andamento della motilità spermatica.

Le suspensioni di spermatozoi ottenute da emissione per shock termico sono state filtrate ed unite costituendo un pool relativamente concentrato di spermatozoi emessi. Aliquote di tale soluzione sono state diluite 1:200 con acqua di mare filtrata (0,45µm) e mantenute a temperatura ambiente, monitorando l'andamento della motilità spermatica.

Conservazione di seme mantenuto a differenti regimi termici

Per determinare la migliore tipologia di conservazione del seme sono stati condotti esperimenti dopo 24 ore di conservazione del materiale biologico a differenti regimi termici:

- ✓ Valutazione dello sperma ottenuto da prelievo bioptico e da emissione per shock termico conservato a freddo

In questo esperimento è stato utilizzato seme ottenuto da prelievo bioptico e da emissione indotta mediante shock termico. Entrambe le serie di campioni sono state mantenute inattive a freddo (3°C) per 24 ore. In seguito il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata e mantenuto a 18 ±1°C, monitorandone l'andamento della motilità spermatica.

- ✓ Valutazione del seme ottenuto da prelievo biotico conservato inattivo a tre temperature diverse

In questo esperimento è stato utilizzato seme ottenuto da prelievo biotico. Il seme secco è stato suddiviso in aliquote che sono state mantenute inattive a differenti regimi termici (18°C, 7°C e 3°C) per 24 ore. Dopo il periodo di 24 ore il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata e mantenuto a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, monitorandone l'andamento della motilità spermatica.

Per la fase successiva di questo esperimento è stato utilizzato il migliore risultato ottenuto nella fase precedente. Un'aliquota di seme ottenuto da prelievo biotico è stata mantenuta inattiva a freddo (7°C) per 24 ore. In seguito il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata e mantenuto a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, monitorandone l'andamento della motilità spermatica e registrando i parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità e durata totale della motilità spermatica.

➤ *Tapes decussatus*

Per la sperimentazione è stato utilizzato seme di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media $50 \pm 5\text{mm}$), dall'azienda IRSVEM s.r.l. (Bacoli, NA). Gli animali erano provenienti da pesca dal mare della Sardegna, senza essere depurati per evitare l'emissione di gameti (Figura 2).



Figura 2. Aspetto generale dei molluschi utilizzati negli esperimenti.

Il trasporto degli animali in laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo, mantenuto ad una temperatura di 5°C mediante l'uso di ghiaccio. Nel laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati prima di iniziare gli esperimenti.

Ottenimento seme

Il seme è stato ottenuto mediante prelievo biotico introducendo un pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 20 μm per allontanare residui di tessuto gonadale.

Analisi della motilità del seme fresco

Un'aliquota di 10 μl del seme prelevato è stata attivata in 10 ml di acqua di mare filtrata (0,22 μm), mantenuta a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, salinità 30‰, pH 8,02. L'andamento della motilità spermatica è stato

analizzato al microscopio ottico (x200) e registrato con videocamera. L'andamento della motilità è stato seguito nel tempo (Fabbrocini et al., 2000) valutando i parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità spermatica e durata totale della motilità.

➤ *Paracentrotus lividus*

Per le sperimentazioni sono stati utilizzati spermatozoi di riproduttori sessualmente maturi della Stazione Zoologica di Napoli Anton Dohr (1) oppure animali raccolti dall'ambiente naturale nell'area di Sorrento (NA) (2).

1. I ricci della Stazione Zoologica sono stati mantenuti in acquario a circuito aperto per circa un mese e alimentati con *Ulva sp.* Il seme è stato raccolto *in loco* e conservato secco in tubi eppendorf. I campioni sono stati trasportati in camera di polistirolo con temperatura controllata per il Laboratorio di Fisiologia Generale ed Ambientale dell'Università di Napoli per le prove sperimentali.
2. Per quanto riguarda i ricci pescati in mare, il trasporto degli animali fino al laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo, mantenuto ad una temperatura di 5°C mediante l'uso di ghiaccio. In laboratorio tutti i ricci sono stati lavati e mantenuti in acquario in condizioni controllate (salinità $37 \pm 1\%$; temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$; NO_2 $2,5 \pm 1,0$; NO_3 10 ± 5). Gli organismi sono stati alimentati con *Ulva sp.* e pezzi di carote.

Ottenimento seme

Per ogni prova un gruppo di 10 organismi è stato indotto all'emissione. L'ottenimento dello sperma è stato fatto con tre metodi di induzione diversi:

1. Shock meccanico, agitando moderatamente i ricci per tre minuti fino alla liberazione dei gameti;
2. Shock elettrico, applicando 12-24 volt di corrente sui due punti estremi dell'animale, e agitandoli;
3. Shock osmotico, iniettando nel peristoma dell'animale 0,5M KCl (35g/L) e poi agitandolo (Figura 3).



Figura 3. Shock osmotico per mezzo d'iniezione di KCl 0,5M e agitazione.

Ognuno di questi metodi ha i suoi vantaggi e problemi. Per quanto riguarda la necessità di una ridotta quantità di gameti lo shock meccanico è più conveniente perché garantisce un elevato tasso di sopravvivenza. Lo shock elettrico e l'osmotico promuovono maggiori quantità di gameti e l'emissione è più rapida (Gago & Luís, 2011).

Analisi della motilità del seme fresco

Per tutte le fasi sperimentali sono stati utilizzati pool costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di 3. Alla costituzione del pool di seme secco, un'aliquota è stata attivata in acqua di mare filtrata (1:1000 V/V) e ne è stato valutato l'andamento della motilità spermatica. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Subito dopo l'attivazione del pool aliquote di 5µl di seme sono state valutate. La valutazione della motilità è stata fatta in microscopio ottico e registrata sulla videocamera. Le immagini videoregistrate di ciascun esperimento sono state analizzate da tre operatori addestrati con osservazioni indipendenti. Il pattern di motilità degli spermatozoi è stato valutato nel tempo, determinando i quattro parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità, durata totale della motilità spermatica.

In questa fase sono stati condotti esperimenti con ricci mantenuti in acquario e con quelli pescati in mare. Il risultato della motilità è stato rappresentato come la media dei saggi realizzati con la stessa condizione sperimentale: concentrazione del seme $60 \times 10^6/\text{ml}$, attivazione in acqua di mare filtrata nel rapporto 1:1000 (V/V), temperatura d'acqua $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e salinità 36‰.

3.2.2 Le specie alloctone allevate in Italia

➤ *Crassostrea gigas*

Per la sperimentazione è stato utilizzato sperma di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media $100 \pm 10\text{mm}$), dall'azienda IRSEVEM. s.r.l. (Bacoli, NA) e del *Laboratorio de Moluscos Marinhos* della *Universidade Federal de Santa Catarina – LMM/USFC* (Florianópolis, Brasile). Gli animali provenivano da acquacoltura, senza essere stati depurati per evitare l'emissione dei gameti (Figura 4).

Il trasporto degli animali in laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo, mantenuto ad una temperatura di 5°C mediante l'uso di ghiaccio. Nel laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati e puliti dagli organismi incrostanti prima di iniziare gli esperimenti.



Figura 4. Esemplari di ostrica giapponese *Crassostrea gigas* utilizzati negli esperimenti. Alla sinistra l'ostrica allevata in Italia fornito da IRSEVEM s.r.l. e alla destra quella allevata in Brasile presso il *Laboratorio de Moluscos Marinhos - LMM/UFSC*.

Ottenimento seme

Il seme è stato ottenuto mediante prelievo biotico introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 20 µm per allontanare residui di tessuto gonadale. Un'aliquota di ogni campione è stata attivata in acqua di mare filtrata a temperatura ambiente (1:1000 V/V) per la valutazione della qualità dello sperma. La motilità è stata valutata al microscopio ottico (x200) e i campioni maggiori di classe 3,0 sono stati utilizzati per la formazione dei pools.

Analisi della motilità del seme fresco

In questo esperimento sono stati utilizzati pools di spermatozoi di animali allevati nel Mediterraneo. Campioni di spermatozoi con scarsa motilità spermatica sono stati scartati. La formazione dei pools sono stati formati da seme di un minimo di 3 molluschi.

Un'aliquota di 10 µl del seme prelevato è stata attivata in 1 ml di acqua di mare (1:10 V/V), mantenuta a 24°C, salinità 35‰ e pH 8,17. La motilità degli spermatozoi è stata valutata nel tempo determinandone i parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità, durata totale della motilità spermatica. La motilità è stata osservata e filmata sul microscopio e valutata da 3 operatori indipendenti in classe di motilità (Fabbrocini et al., 2000).

Capacità di attivazione dello sperma mantenuto a differenti regimi termici

Per determinare anche la capacità di attivazione il seme è stato mantenuto a due temperature di conservazione per 24 ore dal prelievo biotico del materiale biologico.

Il seme secco è stato suddiviso in aliquote che sono state mantenute inattive a differenti regimi termici (25°C e 7°C) per 24 ore. In seguito il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata (24°C, 35‰ e pH 8,28) monitorandone l'andamento della motilità spermatica.

➤ *Tapes philippinarum*

Per le sperimentazioni sono stati utilizzati riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media 39 ±4mm), dall'azienda IRSEVEM s.r.l. (Bacoli, NA). Gli animali provenivano da allevamenti nel nord-est d'Italia senza essere depurati per evitare l'emissione di gameti.

Il trasporto degli animali è stato effettuato a secco in ambiente termostatico (camion), mantenuto ad una temperatura di 5°C. In laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati prima di iniziare gli esperimenti.

Ottenimento seme

Il seme è stato ottenuto mediante prelievo biotico introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale (Figura 5). Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 20 µm per allontanare residui di tessuto gonadale. La sospensione di spermatozoi è stata attivata diluendo il liquido seminale con acqua di mare filtrata sterilizzata (0,22 µm; 25°C; 30‰; pH 8,14).



Figura 5. Morfologia interna della vongola asiatica *Tapes philippinarum*. Le frecce indicano il dettaglio della gonada matura (sinistra) e quella non matura (destra).

Analisi della motilità del seme fresco

Aliquote di 10 μ l del seme prelevato sono state attivate in 10 ml di acqua di mare, mantenuta a 25°C, salinità 30‰, pH 8,80 e valutate l'andamento della motilità spermatica nel tempo.

Capacità di attivazione e valutazione della qualità dello sperma conservato a freddo

E' stata valutata la capacità di attivazione e la qualità dello sperma conservato a freddo e a temperatura ambiente per 24 ore del prelievo biotico.

Pools di sperma secco sono stati ottenuti da maschi maturi e aliquote di 10 μ l sono stati immediatamente attivate in 10 ml di acqua di mare filtrata (temperatura 24°C, salinità 32‰ e pH 9,35) per la valutazione dell'andamento della motilità spermatica nel tempo. Altri aliquote di sperma secco sono stati conservate a freddo (7°C) per 24 ore. Dopo questo periodo il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata nelle stesse condizioni monitorandone l'andamento della motilità spermatica.

Effetto della salinità sulla motilità spermatica

In questo esperimento è stato valutato l'effetto della salinità sulla motilità spermatica. Pools di sperma secco sono stati ottenuti con prelievo biotico da riproduttori maturi. Aliquote di 10 μ l di sperma sono stati attivate in 10 ml di acqua di mare filtrata (0,45 μ m) a una temperatura di 23,5°C, pH 8,74 in due salinità distinte: 29‰ e 32‰. La motilità spermatica è stata valutata nel tempo da 3 operatori indipendenti.

3.2.3 Le specie autoctone brasiliane

➤ *Perna perna*

Per le sperimentazioni sono stati utilizzati i semi di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media $80 \pm 5\text{mm}$) con le gonadi in stadio di sviluppo IIIA, caratterizzate per il mantello molto spesso e i follicoli totalmente pieni di gameti (Lunetta, 1969). Gli animali erano provenienti da esperimenti di mitilicoltura della *Universidade Federal de Santa Catarina* situati nel nordovest dell'Isola di Santa Catarina - Florianópolis, Brasile (Figura 6).

Il trasporto degli animali in laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo, mantenuto ad una temperatura di 5°C mediante l'uso di ghiaccio. In laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati e puliti da organismi incrostanti prima di iniziare gli esperimenti.



Figura 6. Allevamento di molluschi della *Universidade Federal de Santa Catarina* - UFSC, localizzato in Sambaqui/Florianópolis, Regione Sud del Brasile. (Foto: Vitor A. Pontinha)

Ottenimento seme

Prelievo bioptico

Il seme è stato ottenuto introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di $20\ \mu\text{m}$ per allontanare residui di tessuto gonadale.

La sospensione di spermatozoi è stata attivata miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata sterilizzata a temperatura ambiente (1:1000 V/V). La qualità dello sperma è stata previamente valutata al microscopio ottico (x200) ed i campioni con motilità maggiore di classe 3,0 sono stati utilizzati per la formazione dei pools.

Emissione gametica

Prove di emissione sono state condotte sottoponendo i molluschi a successivi shock termici e raccolti singolarmente al fine di selezionare le emissioni di migliore qualità con cui costituire i pools di spermatozoi utilizzati per la sperimentazione (Figura 7).

Pertanto i molluschi sono stati immersi individualmente in contenitori con acqua di mare filtrata e sterilizzata (0,45 µm) a 22°C con ricambi periodici dell'acqua sotto a sequenziali shock termici da 2-4°C (Di Matteo et al., 2009). Dopo l'emissione, la sospensione spermatica è stata filtrata 20 µm e la motilità valutata al microscopio (x200) per la formazione dei pools.



Figura 7. Prove di emissione gametica con il mitilo *Perna perna*. Alla sinistra gli organismi posizionati singolarmente nella vasca con ricambio termico dell'acqua. Nel centro il dettaglio del mollusco sottoposto a shock. Nella destra un maschio sessualmente maturo.

Effetto del prelievo biotico e dell'emissione sulla motilità spermatica

In questa prova è stata valutata la motilità nel tempo degli spermatozoi ottenuti da prelievo biotico e di quelli emessi mediante induzione per shock termico. Per ogni esperimento sono state utilizzati molluschi maturi per ogni metodologia (biotico/emissione) e formati rispettivi i pools con i migliori campioni di seme con motilità superiore alla classe 3,0. Per ciascun pool le concentrazioni spermatiche sono state aggiustate a 10^4 - 10^6 cel/ml.

Il sem ottenuto da prelievo biotico è stato attivato mediante diluizione 1:1000 (V/V) con acqua di mare filtrata (0,45µm) e mantenuta a temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), salinità 35‰, pH 8,0-8,5.

Le sospensioni ottenute da emissione per shock termico sono state filtrate ed unite costituendo pools relativamente concentrati di spermatozoi emessi. Aliquote di tali soluzioni sono state diluite con acqua di mare filtrata e mantenuta nelle stesse condizioni del seme precedente. L'andamento della motilità spermatica di tutti campioni è stata osservata e registrata nel tempo.

Analisi della motilità del seme fresco

Aliquote di 10 µl del seme prelevato sono state attivate in 10 ml di acqua di mare (24×10^6 spz/ml), mantenuta a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, salinità 29‰, pH 8,12. Immediatamente dopo l'attivazione la motilità spermatica è stata analizzata al microscopio ottico (x200) e registrato con videocamera.

L'andamento della motilità è stato osservato e valutato in classi di motilità (Fabbrocini et al., 2000) seguendo i parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità e durata totale della motilità spermatica.

Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a differenti regimi termici

Per determinare la migliore tipologia di conservazione del seme sono stati condotti esperimenti di conservazione del materiale biologico a differenti regimi termici. In questi esperimenti è stato utilizzato seme secco inattivato ottenuto da prelievo bioptico suddiviso in aliquote di seme senza diluizione e di seme diluito in acqua di mare nel rapporto 1:50 (V/V). Le aliquote di seme inattivato sono state conservate a due regimi termici per 10 giorni: a freddo (8°C) e a temperatura ambiente (23°C). Ogni 24 ore la motilità spermatica è stata valutata.

Effetto della salinità sulla motilità spermatica

Pools di seme secco sono stati formati con prelievo bioptico da riproduttori maturi. Aliquote di 10 µl di seme sono stati attivati in 10 ml di acqua di mare filtrata (0,45µm) a una temperatura di 25°C, pH 8,50 in due salinità distinte: 26‰ e 31‰. La motilità degli spermatozoi è stata valutata nel tempo da 3 operatori indipendenti.

➤ *Crassostrea brasiliiana (gasar)*

E' stato utilizzato seme di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media 50 ±5mm) provenienti da allevamento per la ricerca della *Universidade Federal de Santa Catarina* in Florianópolis, Brasile.

Il trasporto degli animali in laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo. Nel laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati e puliti da organismi incrostanti prima di iniziare gli esperimenti.

Ottenimento seme

Prelievo bioptico

Il seme è stato ottenuto introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale dopo alcuni lievi tagli nella superficie delle gonadi. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 20 µm per allontanare residui di tessuto gonadale.

La sospensione di spermatozoi è stata attivata miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata e sterilizzata a temperatura ambiente (1:1000 V/V). La qualità del seme è stata previamente valutata al microscopio ottico (x200) e i campioni con migliore motilità (Classe ≥3,0) sono stati utilizzati per la formazione dei pools.

Emissione gametica

Prove di emissione sono state condotte sottoponendo l'ostriche a successivi shock termici singolarmente al fine di selezionare l'emissioni di migliore qualità con cui costituire i pools di spermatozoi utilizzati per la sperimentazione (Figura 8).

Pertanto i molluschi sono stati immersi individualmente in acqua di mare filtrata e sterilizzata (0,45 µm) a 22°C con ricambi periodici dell'acqua sotto a sequenziali shock termici da 2-4°C. Dopo l'emissione, la sospensione spermatica è stata filtrata 20 µm e la motilità posteriormente valutata al microscopio ottico (x200) per la formazione dei pools.



Figura 8. Dettagli dell'ottenimento dei semi dell'ostrica *Crassostrea brasiliiana* mediante prelievo biotico (sinistra) e emissione indotta per mezzo di shock termici.

Effetto del prelievo biotico e dell'emissione'ottenimento sulla motilità spermatica

Per ogni prova sono state utilizzate pools di seme ottenuti da molluschi maturi. Per ciascun pool le concentrazioni spermatiche sono state aggiustate a 10^6 cel/ml.

Lo sperma ottenuto da prelievo biotico è stato attivato mediante diluizione 1:1000 (V/V) con acqua di mare filtrata ($0,45\mu\text{m}$) e mantenuta a temperatura ambiente (22°C), salinità 36%, pH 8,0-8,5.

Le sospensioni ottenute da emissione per shock termico sono state filtrate ($20\mu\text{m}$), valutate ed unite costituendo pools di spermatozoi emessi. Aliquote di tale soluzione sono stati diluite con acqua di mare filtrata e mantenuta nelle stesse condizioni. La motilità spermatica è stata osservata e registrata nel tempo.

Analisi della motilità del seme fresco

Aliquote di $10\mu\text{l}$ del pool ottenuto da prelievo biotico sono state attivate in 10 ml di acqua di mare (5×10^6 cel./ml) mantenuta a 22°C , salinità 36‰ e pH 8,0-8,5. Immediatamente dopo l'attivazione l'andamento della motilità spermatica è stato analizzato in microscopio ottico (x200) e registrato in videocamera. L'andamento della motilità è stato valutato in classi di motilità (Fabbrocini et al., 2000) ed i parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità e durata totale della motilità spermatica.

➤ *Crassostrea rhizophorae*

Sono stati utilizzati semi di riproduttori sessualmente maturi (lunghezza media $35 \pm 5\text{mm}$) provenienti da allevamento dell' *Universidade Federal de Santa Catarina* in Sambaqui/Florianópolis, Brasile.

Il trasporto degli animali in laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo. Nel laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati e puliti da organismi incrostanti prima di iniziare gli esperimenti.

Ottenimento seme

Il seme è stato ottenuto introducendo una pipetta Pasteur all'interno del tessuto gonadale dopo alcuni tagli nella superficie delle gonadi. Il materiale recuperato è stato filtrato utilizzando un setaccio a maglia di 20 µm per allontanare residui di tessuto gonadale.

La sospensione di spermatozoi è stata attivata miscelando il liquido seminale con acqua di mare filtrata e sterilizzata a temperatura ambiente (1:1000 V/V). La qualità dello sperma è stata previamente valutata al microscopio ottico (x200) e i campioni con migliore motilità (\geq classe 3,0) sono stati utilizzati per la formazione dei pools.

Analisi della motilità del seme fresco

Aliquote di 10 µl dei pools ottenuti da prelievo biotico proveniente da maschi maturi è stata attivata in 10 ml di acqua di mare ($5 \cdot 10^6$ cel./ml) mantenuta a 23°C, salinità 35‰ e pH 8,40. Immediatamente dopo l'attivazione l'andamento della motilità spermatica è stato analizzato al microscopio ottico (x200) e registrato con videocamera. L'andamento della motilità è stato osservato nel tempo e valutato in classe di motilità (Fabbrocini et al., 2000) registrando allo stesso modo i parametri della motilità: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità e durata totale della motilità spermatica.

Capacità di attivazione nel tempo del seme mantenuto a freddo

Per determinare l'effetto della conservazione al freddo sulla motilità spermatica sono stati condotti esperimenti di conservazione del materiale biologico. Pools di seme secco sono stati conservati a freddo (8°C) in tubi eppendorf da 2 ml per 48 ore. La motilità spermatica è stata valutata dopo attivazione 1:100 (V/V) in acqua di mare filtrata e sterilizzata (23°C; 35‰).

➤ *Nodipecten nodosus*

Sono stati utilizzati semi di riproduttori sessualmente maturi provenienti da allevamento commerciale in Porto Belo (27 08'63"S 48 32'66"O), Santa Catarina, Regione Sud del Brasile.

Il trasporto degli animali fino al laboratorio è stato effettuato a secco in camera di polistirolo. Nel laboratorio tutti i molluschi sono stati lavati e puliti da organismi incrostanti prima d'iniziare gli esperimenti.

Le capesante sono state mantenute in vasche da 50 litri a circuito chiuso in condizioni controllate ($18 \pm 1^\circ\text{C}$, $35 \pm 1\%$) per mantenere le gonadi in "stand-by" per gli esperimenti. I molluschi erano alimentati regolarmente con una miscela di *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* (rapporto 1:4) nella concentrazione totale di $5 \cdot 10^9$ cellule/ind/giorno, a flusso continuo.

Ottenimento dei gameti

Prove di emissione sono state condotte sottoponendo i molluschi a successivi shock termici e raccolti singolarmente al fine di selezionare le emissioni di migliore qualità con cui costituire i pool di spermatozoi ed ovociti utilizzati per la sperimentazione (Figura 9).

Pertanto i molluschi sono stati immersi in acqua di mare filtrata e sterilizzata (0,45 µm) a 22°C con ricambi periodici dell'acqua sotto a sequenziali shock termici (Rupp & Poli, 1994). Dopo l'emissione, le sospensioni sono state filtrate (18 µm seme/ 30µm ovociti) e la qualità dei gameti valutata per la formazione dei pools.



Figura 9. Prove di emissione gametica della capasanta *Nodipecten nodosus*. Alla sinistra gli organismi posizionati singolarmente con ricambio termico dell'acqua. Alla destra una tipica emissione di gameti femminile (aranciata) e gameti maschile (opaca).

La valutazione della qualità del seme è stata realizzata subito dopo l'emissione in acqua di mare filtrata ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $35 \pm 1\text{‰}$). Campioni di $10 \mu\text{L}$ sono stati valutati mediante analisi visuale in microscopio ottico ($200\times$). La qualità del seme è stata valutata in classi di motilità (Fabbrocini et al., 2000).

La valutazione degli ovociti è stata effettuata da analisi macro e microscopica. L'analisi macroscopica è stata fatta per mezzo dell'osservazione degli aspetti morfologici della porzione femminile della gonade (Sühnel et al., 2010) mentre l'analisi microscopica è stata basata sugli aspetti morfologici degli ovociti (De la Roche et al., 2002).

Analisi della motilità del seme fresco

In questa prova i pools ottenuti da emissione proveniente da molluschi maturi sono stati utilizzati come riferimento. L'emissione degli spermatozoi è stata fatta in acqua di mare filtrata e sterilizzata mantenuta a 22°C , salinità 36‰ e pH 8,20. Aliquote di $10 \mu\text{L}$ della sospensione spermatica sono stati utilizzate per valutare l'andamento della motilità nel tempo. La valutazione della motilità è stata fatta al microscopio ottico ($\times 200$) e registrata con videocamera. La motilità è stata valutata in classi di motilità (Fabbrocini et al., 2000) registrandone i parametri: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità e durata totale della motilità spermatica.

L'andamento della motilità spermatica del seme mantenuto in differenti regimi termici

In questa prova è stato analizzato l'andamento della motilità spermatica del seme emesso e mantenuto per 5 ore a due temperature distinte: temperatura ambiente (22°C) e a freddo (7°C).

Pools di spermatozoi emessi provenienti da molluschi maturi sono stati suddivisi in aliquote che sono state mantenute a differenti regimi termici. Il seme è stato mantenuto in acqua di mare filtrata (salinità 36‰ ; pH 8,30) monitorandone l'andamento della motilità spermatica nel tempo.

3.3 Risultati e Discussioni

3.3.1 Le specie mediterranee

➤ *Mytilus galloprovincialis*

Effetto del prelievo biotico e dell'emissione'ottenimento sulla motilità spermatica

Per quanto riguarda il seme ottenuto da emissione indotta, la massima classe di motilità è arrivata a classe 5,0 (100% spermatozoi RVL) immediatamente ed è rimasta tale fino a 30 minuti (Figura 10). Al fine della sperimentazione, dopo 150 minuti, la motilità era ancora buona con la classe 3,5. Il campione di seme ottenuto da prelievo biotico ha raggiunto la massima classe di motilità (4,0) anche esso immediatamente. Trascorsi 45 minuti dall'attivazione, la motilità è scesa a classe 3,0, mantenendo questo pattern di motilità fino a 120 minuti e scendendo a classe 2,5 a 150 minuti.

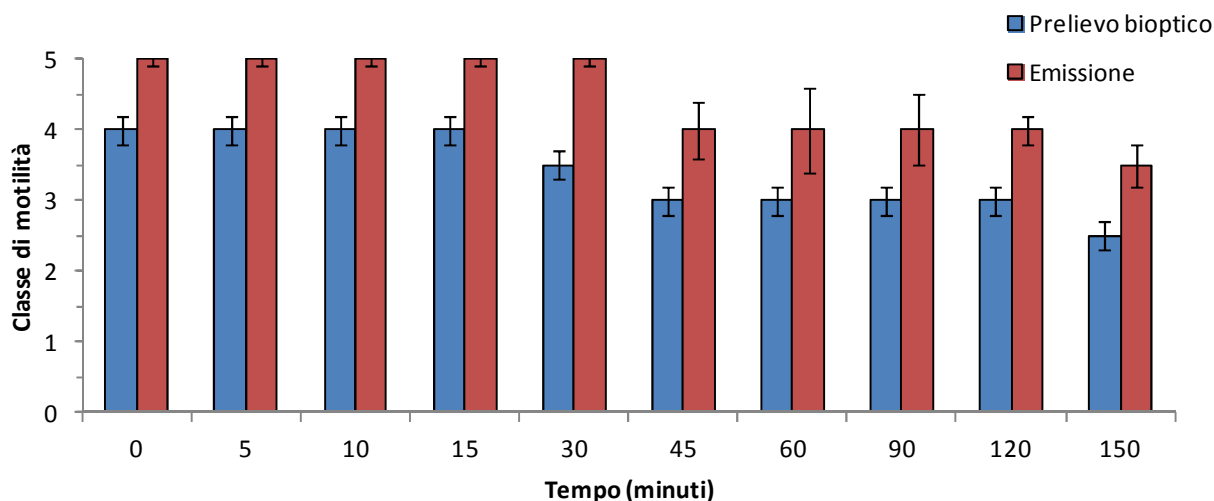


Figura 10. L'andamento della motilità spermatica di *Mytilus galloprovincialis* mediante prelievo biotico e emissione indotta per shock termico.

Dal confronto con la motilità spermatica del seme ottenuto mediante prelievo biotico e emissione indotta si evince una percentuale di spermatozoi RVL più elevata per l'emissione indotta. Tuttavia entrambi i campioni hanno dimostrato motilità superiore a classe 3,0 ed idoneità per fecondazione fino a 120 minuti dopo l'attivazione.

Nella riproduzione in laboratorio la tecnica di ottenimento dei gameti è un fattore critico per il successo della fecondazione. Per determinate specie di molluschi la motilità degli spermatozoi è più efficiente quando è realizzata per mezzo di emissione indotta rispetto ai risultati ottenuti con la tecnica di prelievo biotico (Mojares et al., 1995). Uguale è il risultato osservato per il mitilo *Dreissena polymorpha* in cui l'emissione indotta si è rivelata la tecnica più adatta per l'ottenimento di seme.

Conservazione di seme mantenuto a differenti regimi termici

- ✓ Valutazione dello sperma conservato a freddo e ottenuto da prelievo biotico e da emissione per shock termico.

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Mytilus galloprovincialis* da prelievo biotico e da emissione indotta dopo 24 ore di conservazione a freddo (7°C) ed attivati in acqua di mare a $18\pm1^\circ\text{C}$ è riportato nella Figura 11.

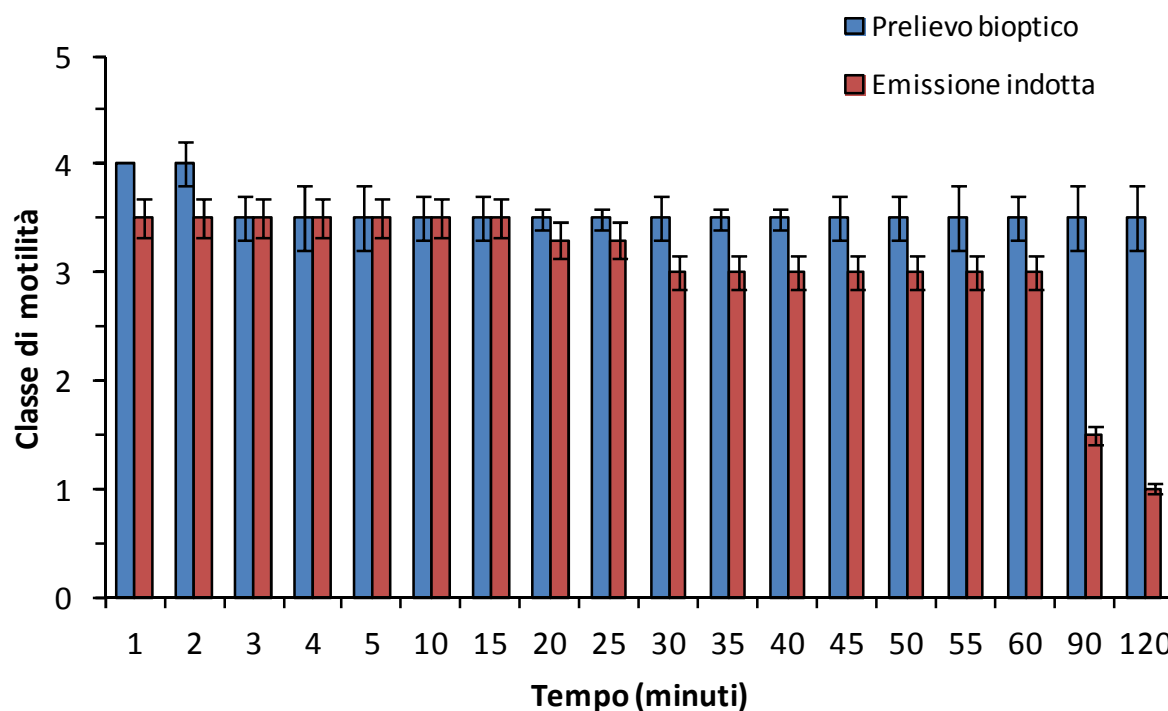


Figura 11. Andamento della motilità spermatica di *Mytilus galloprovincialis* dopo la conservazione del seme per 24 ore a freddo (7°C) ottenuto da due tipologie distinte: prelievo biotico ed emissione indotta.

Il seme ottenuto da prelievo biotico ha raggiunto la massima classe di motilità (classe 4,0 \pm 0,2) dopo un minuto dall'attivazione mantenendo la classe 3,0 per 120 minuti. La massima classe di motilità del seme proveniente da emissione indotta ha raggiunto 3,5 \pm 0,2 ed è stata mantenuta per 15 minuti, scendendo lentamente a classe 3,0 dopo 60 minuti.

Dal confronto tra le due tipologie si evince una migliore qualità del seme ottenuto da prelievo biotico. Tale risultato conferma che il seme secco risulta non soltanto qualitativamente migliore in termini di andamento della motilità spermatica, ma anche più idoneo all'utilizzo nelle 24 ore successive all'ottenimento.

- ✓ Valutazione del seme ottenuto da prelievo biotico conservato inattivo in tre temperature diverse

Dopo 24 ore il seme conservato a 3°C non ha mostrato alcuna motilità. La migliore performance è stata quella del seme conservato a 7°C in cui la massima classe di motilità ha raggiunto classe 4,5 e si è mantenuta per più di 15 minuti. Il seme conservato a temperatura ambiente (18°C) non ha avuto una buona "performance" ed è stata osservata una notevole perdita di motilità (Figura 12).

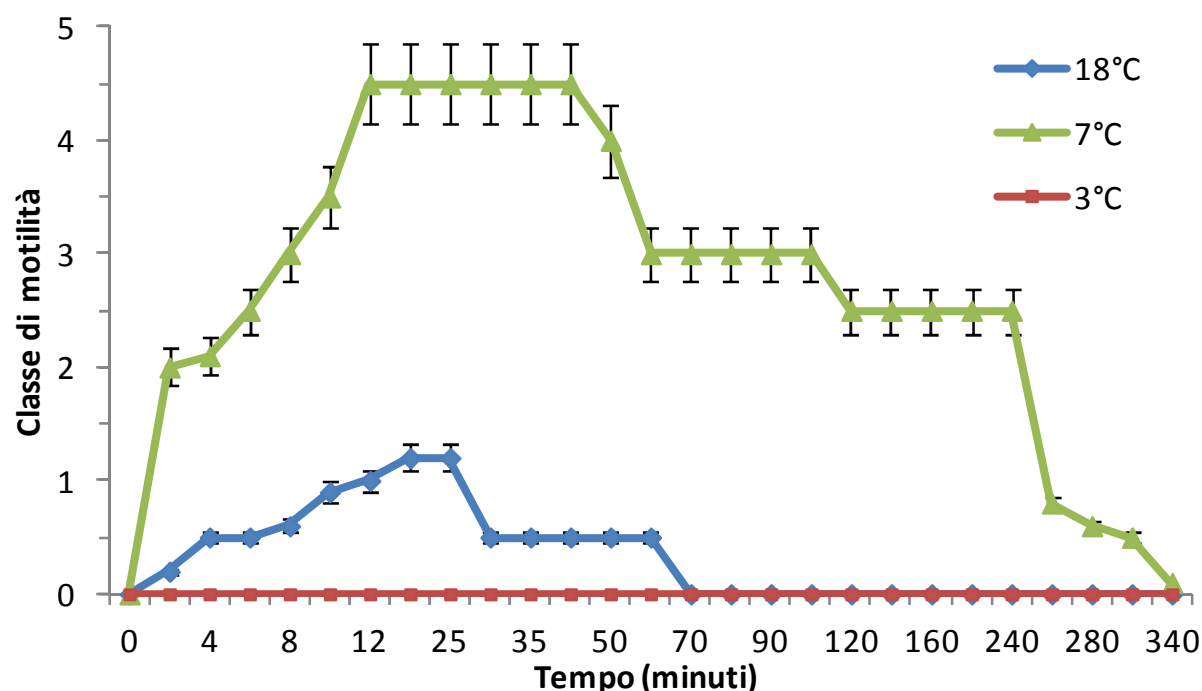


Figura 12. Andamento della motilità spermatica di *Mytilus galloprovincialis* ottenuta da prelievo bioptico e conservato per 24 ore in 18°C (temperatura ambiente), 7°C, 3°C.

L'andamento della motilità osservato in questo esperimento ha dimostrato l'effetto della temperatura sulla qualità dello sperma e soprattutto l'importanza della corretta conservazione del materiale biologico per tempi lunghi. Il risultato dimostra che la conservazione a 7°C è stata la migliore modalità di conservazione per il seme, e pertanto tale condizione è stata scelta per effettuare la valutazione degli parametri fisiologici della motilità.

Per quanto riguarda il seme conservato a 7°C, dopo 10 minuti dall'attivazione gli spermatozoi hanno raggiunto motilità spermatica superiore a classe 3,0, facendo durare questa intensità per 110 minuti. Dopo 240 minuti dall'attivazione la motilità è discesa accentuatamente ed è zero a 340 minuti. Nella Tabella II sono riportati i parametri fisiologici della motilità spermatica.

Tabella II. Parametri fisiologici della motilità spermatica di *Mytilus galloprovincialis* dopo 24 ore di conservazione del seme a freddo (7°C).

| Parametro | Attivazione 24 ore |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 10' |
| Massima classe di motilità | 4,5 ±0,2 |
| Durata della massima motilità | 110' |
| Durata totale della motilità | 340' |

Il risultato ottenuto in questo esperimento è comparabile con gli esperimenti precedenti sull'andamento della motilità del seme analizzato subito dopo il prelievo (Del Prete et al., 2011). Questi autori osservarono valori della massima classe di motilità pari a classe 4,5 e la durata della massima motilità mantenuta per 105 minuti senza l'effetto della conservazione a freddo ma senza dati sulla durata totale. Tali risultati dimostrano la migliore conservazione a 7°C per la gestione del seme di questa specie per un più lungo periodo. Per eventuali sperimentazioni tale sistema biologico va, dunque, selezionato il seme ottenuto da prelievo biotico per la migliore conservabilità dimostrata, per la gestione futura degli esperimenti.

➤ *Tapes decussatus*

Analisi della motilità del seme fresco

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Tapes decussatus* da prelievo biotico e attivati in acqua di mare filtrata a $18\pm1^\circ\text{C}$ è riportato nella Figura 13.

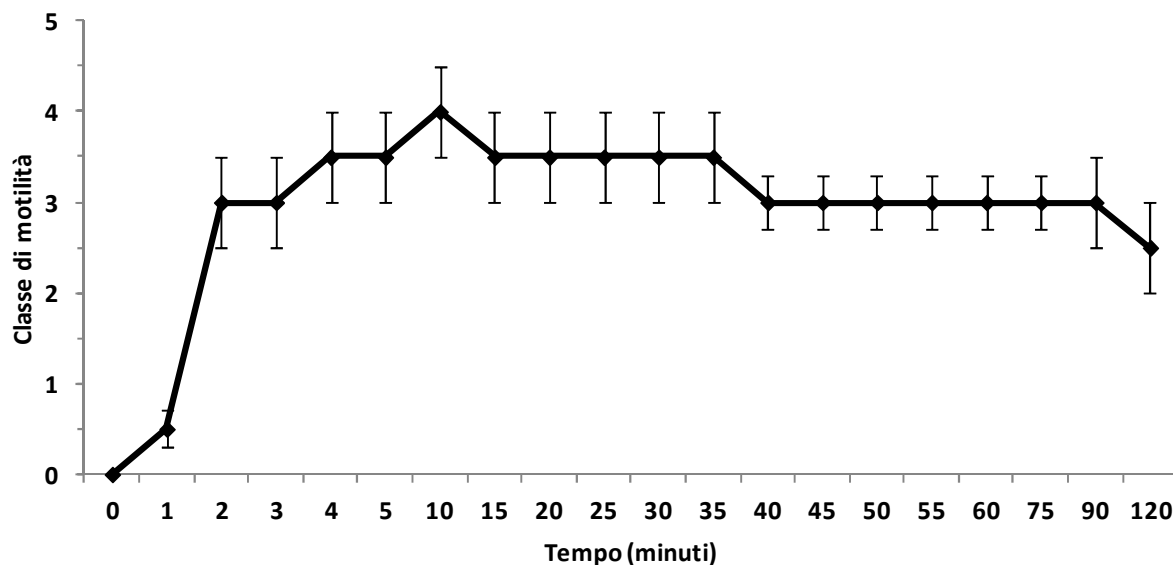


Figura 13. Andamento della motilità spermatica di *Tapes decussatus* del seme ottenuto da prelievo biotico e attivato immediatamente in acqua di mare filtrata (18°C , 30‰, pH 8,02).

Il seme attivato a 18°C ha raggiunto motilità spermatica superiore a classe 3,0 dopo 2 minuti dall'attivazione, facendo durare questa intensità per circa 90 minuti. La massima classe di motilità è stata raggiunta dopo 10 minuti dall'attivazione con valori classe $4,0 \pm 0,5$. Successivamente la motilità è discesa lentamente fino a classe $2,5 \pm 0,5$ ed al termine dell'osservazione a 120 minuti. Risultato diverso è stato ottenuto da Fabbrocini & D'Adamo (2009) dove la motilità spermatica di *T. decussatus* decresce già dopo 45 minuti dall'attivazione. In Tabella III sono riportati i parametri fisiologici della motilità registrati nell'esperimento.

Tabella III. Parametri fisiologici della motilità spermatica di *Tapes decussatus* ottenuto da prelievo bioptico e attivato in acqua di mare filtrata a 18°C.

| Parametro | Attivazione (18°C) |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 10' |
| Massima classe di motilità | 4,0 ±0,5 |
| Durata della massima motilità | 88' |
| Durata totale della motilità | >120' |

Il risultato dimostra che i parametri ottenuti sono paragonabili agli altri molluschi bivalvi mediterranei studiati precedentemente: *Mytilus galloprovincialis*, *Pecten jacobaeus* e *Ostrea edulis* (Del Prete et al., 2011). Tuttavia la motilità spermatica di *T. decussatus* ha dimostrato di essere superiore a *P. jacobaeus* e *O. edulis* nella valutazione dei parametri fisiologici della motilità, soprattutto nella durata della massima classe di motilità, ma inferiore rispetto a *M. galloprovincialis*.

➤ *Paracentrotus lividus*

Analisi della motilità del seme fresco

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Paracentrotus lividus* da prelievo bioptico e attivati in acqua di mare filtrata a 21±1°C è riportato nella Figura 14.

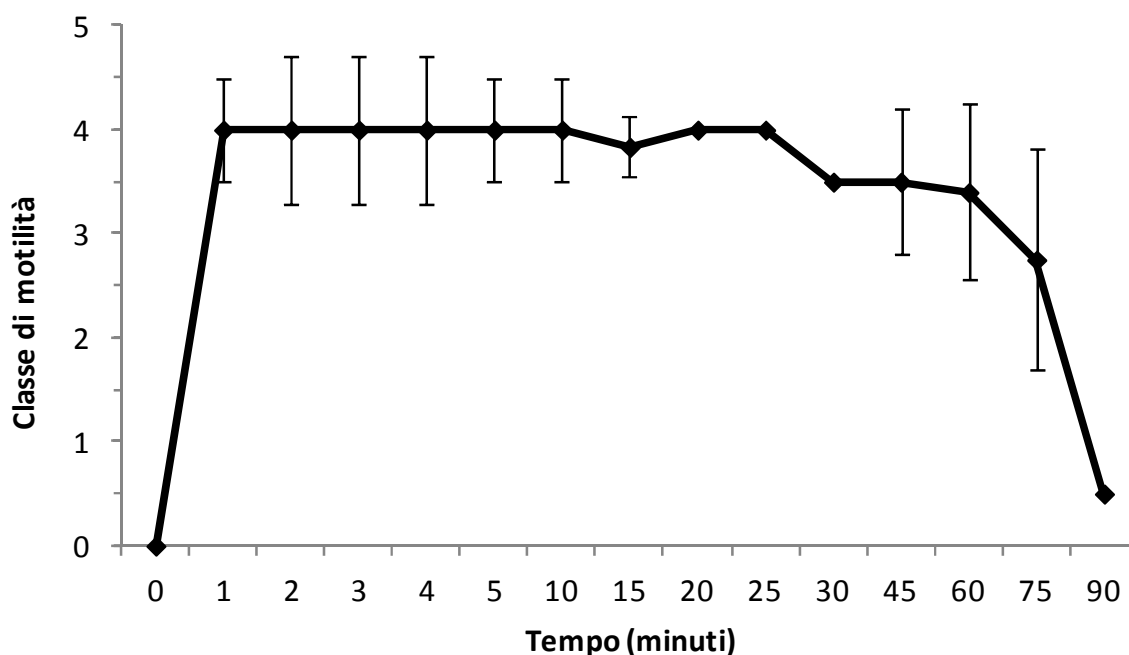


Figura 14. Andamento della motilità spermatica di *Paracentrotus lividus* mediante emissione indotta con attivazione in acqua di mare a 21°C.

Gli spermatozoi hanno raggiunto la massima classe di motilità (classe $4,0 \pm 0,7$) nel primo minuto dall'attivazione, facendo durare questa intensità per circa 25 minuti. In seguito la motilità si è leggermente ridotta a classe 3,5 facendo durare questo pattern fino a 75 minuti dopo l'attivazione. Successivamente la motilità è scesa rapidamente fino a raggiungere classe 0,5 in 90 minuti. Nella Tabella IV sono riportati i parametri fisiologici della motilità registrati nell'esperimento realizzato con *Paracentrotus lividus*.

Tabella IV. Parametri fisiologici della motilità spermatica di *Paracentrotus lividus* ottenuto da emissione indotta e attivato in acqua di mare filtrata a 21°C.

| Parametro | Attivazione (21°C) |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 1' |
| Massima classe di motilità | $4,0 \pm 0,7$ |
| Durata della massima motilità | 75' |
| Durata totale della motilità | >90' |

Il risultato raggiunto in questo esperimento mostra la buona motilità (classe $\geq 3,0$) del materiale biologico per 75 minuti dopo l'attivazione. In esperimenti precedenti condotti da Lombardi (2006) e Vitiello (2011) è stata verificata una durata superiore della massima classe di motilità (120-160 minuti) sia nelle stesse condizione che a più basse temperature (10°C).

3.3.2 Le specie alloctone allevate in Italia

➤ *Crassostrea gigas*

Analisi della motilità del seme fresco

L'andamento della motilità di spermatozoi dell'ostrica giapponese *Crassostrea gigas* allevati in Italia è riportato nella Figura 15. Il seme è stato ottenuto da prelievo biotico e attivato in acqua di mare filtrata a 24°C.

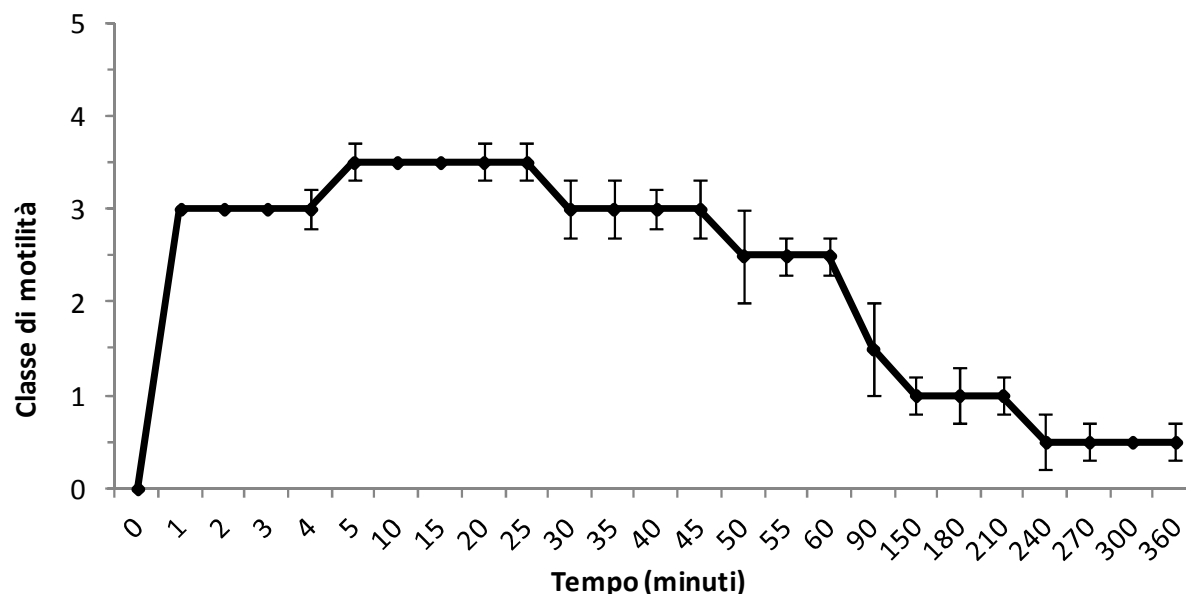


Figura 15. Andamento della motilità spermatica dell’ostrica *Crassostrea gigas* fornito da IRSVEM s.r.l. Il seme è stato ottenuto da prelievo biotico con attivazione in acqua di mare a temperatura 24°C.

Subito dopo l’attivazione gli spermatozoi di *C. gigas* hanno raggiunto la classe 3,0. La massima classe di motilità è stata raggiunta dopo 5 minuti dall’attivazione (classe 3,5 \pm 0,2) facendo durare questa intensità per circa 20 minuti. In seguito la motilità è ridotta a classe 3,0 facendo durare questa classe fino a 45 minuti dopo l’attivazione. Dal 90° minuto in poi la motilità è discesa fino a raggiungere classe 0,5 al 360° minuto. Nella Tabella V sono riportati i parametri fisiologici della motilità spermatica di *Crassostrea gigas* registrati nell’esperimento.

Tabella V. Parametri fisiologici della motilità del seme dell’ostrica giapponese *Crassostrea gigas* ottenuto da prelievo biotico e attivato in acqua di mare filtrata a 24°C.

| Parametro | Attivazione (24°C) |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 5' |
| Massima classe di motilità | 3,5 \pm 0,2 |
| Durata della massima motilità | 45' |
| Durata totale della motilità | >360' |

Il risultato raggiunto in questo esperimento mostra buona motilità (classe \geq 3,0) del materiale biologico per 45 minuti dopo l’attivazione. Questa durata conferma il risultato ottenuto da esperimenti precedenti realizzati con *C. gigas* nel sud del Brasile dove il pattern di massima motilità ha avuto una durata di 40 minuti (Turek, 2010). La massima classe di motilità ha raggiunto soltanto la classe 3,5 corrispondente a 65% di spermatozoi rapidi, vigorosi e lineari. Ieropoli et al. (2004)

ottennero seme di *C. gigas* con classe di partenza superiore a classe 4,0 ($\geq 80\%$ di spermatozoi RVL) però questi autori non valutarono l'andamento della motilità a lungo nel tempo.

Capacità di attivazione dello sperma mantenuto a differenti regimi termici

L'andamento della motilità di spermatozoi di *Crassostrea gigas* attivati dopo 24 ore di conservazione a temperatura ambiente (25°C) e a freddo (7°C) è riportato nella Figura 16.

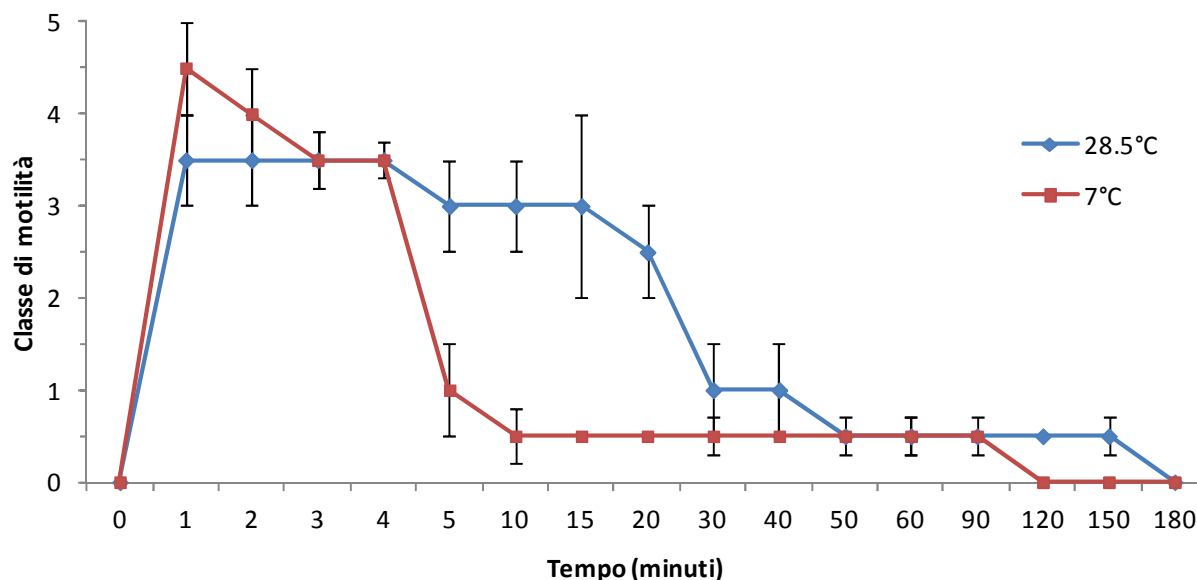


Figura 16. Andamento della motilità spermatica di *Crassostrea gigas* dopo 24 ore di conservazione a temperatura ambiente (25°C) e a freddo (7°C).

Dopo 24 ore il seme mantenuto al freddo (7°C) ha presentato una maggiore massima classe di motilità rispetto a quello mantenuto a temperatura ambiente (25°C). Tuttavia la migliore performance è stata quella dello sperma conservato a temperatura ambiente in cui la durata della massima classe di motilità si mantiene per 15 minuti e la durata totale per 150 minuti. Entrambi i campioni non hanno avuto una buona “performance” rispetto al seme attivato subito dopo il prelievo (Figura 15).

➤ *Tapes philippinarum*

Analisi della motilità del seme fresco

L'andamento della motilità degli spermatozoi della vongola alloctona *Tapes philippinarum* proveniente da allevamento è riportato nella Figura 17.

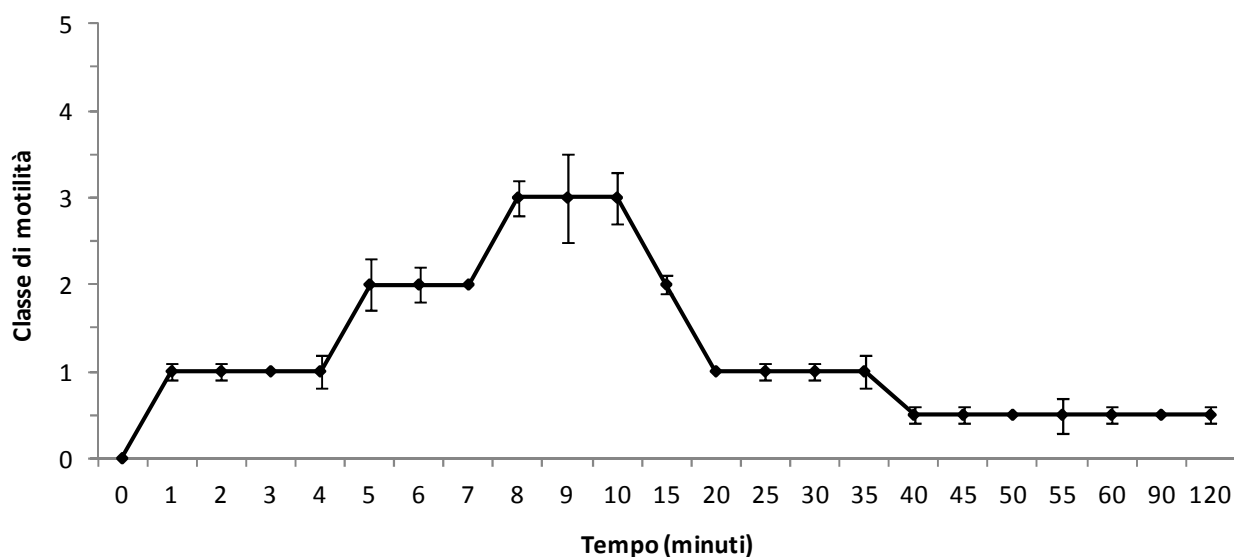


Figura 17. Andamento della motilità spermatica della vongola alloctona *Tapes philippinarum*. Il seme è stato ottenuto da prelievo biotico con attivazione in acqua di mare filtrata a temperatura 25°C, salinità 30‰ e pH 8,80.

Gli spermatozoi hanno raggiunto la massima classe lentamente dopo 8 minuti dall'attivazione. La massima classe di motilità raggiunta (classe $3,0 \pm 0,5$) ha avuto una breve durata (circa 3 minuti). In seguito la motilità si è ridotta a classe 1,0 dopo 15 minuti. Dal 40° minuto in poi la motilità ha mantenuto la classe 0,5 fino a 120 minuti (termine dell'osservazione). Nella Tabella VI sono riportati i parametri fisiologici della motilità spermatica di *Tapes philippinarum* registrati nell'esperimento.

Tabella VI. Parametri fisiologici della motilità del seme della vongola filippina *Tapes philippinarum* ottenuto da prelievo biotico e attivato in acqua di mare filtrata a 25°C.

| Parametro | Attivazione (25°C) |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 8' |
| Massima classe di motilità | $3,0 \pm 0,5$ |
| Durata della massima motilità | 3' |
| Durata totale della motilità | >120' |

La motilità spermatica di *T. philippinarum* ha dimostrato una “performance” inferiore rispetto alla vongola autoctona *T. decussatus* principalmente nel parametro durata della massima classe di motilità.

Capacità di attivazione e qualità dello sperma mantenuto a freddo

Il confronto tra la motilità spermatica della vongola alloctona *Tapes philippinarum* mediante il seme attivato immediatamente dopo il prelievo ed il seme conservato a freddo per 24 ore è riportato nella Figura 18.

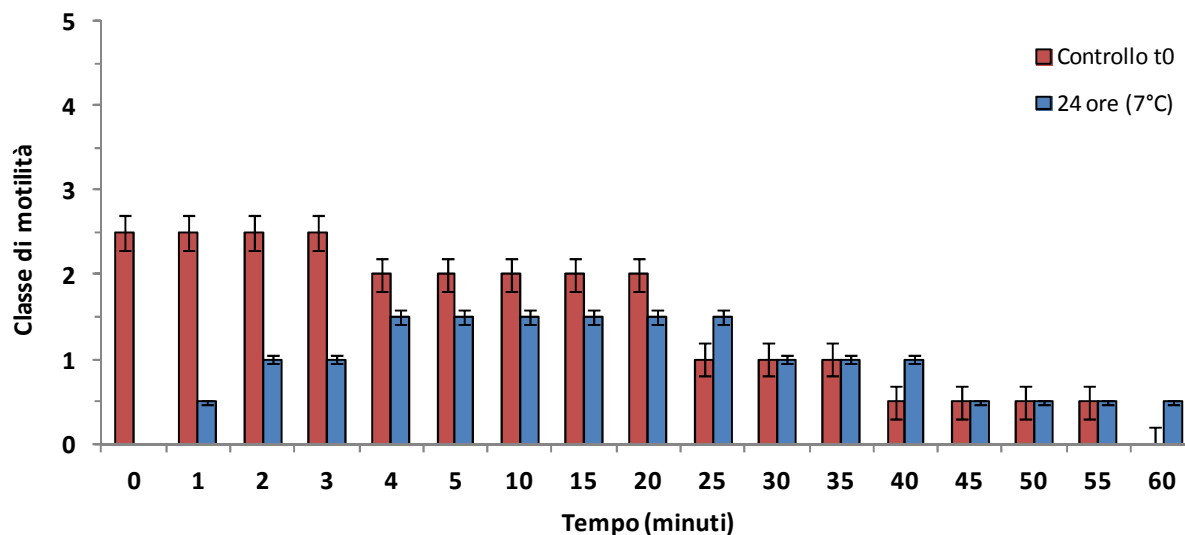


Figura 18. Confronto tra l'andamento della motilità spermatica della vongola alloctona *Tapes philippinarum* del seme immediatamente prelevato (t_0) e conservato a freddo (7°C) per 24 ore.

Il risultato dimostra che il seme conservato a freddo ha avuto una performance inferiore rispetto al controllo nei primi 20 minuti. Dopo 20 minuti dall'attivazione entrambi i campioni hanno avuto andamenti simili. I parametri, tempo di attivazione e massima classe di motilità, hanno dimostrato ampie differenze e il controllo ha evidenziato una migliore qualità. L'effetto della conservazione a freddo sembra avere influenzato il tempo di attivazione che ha esibito un ritardo di 4 minuti rispetto al controllo. Situazione simile è stata osservata per il parametro massima classe di motilità dove il controllo ha raggiunto classe $2,5 \pm 0,2$ e il seme conservato a freddo è arrivato soltanto a classe $1,5 \pm 0,2$.

Effetto della salinità sulla motilità spermatica

Il confronto tra la motilità spermatica della vongola alloctona *Tapes philippinarum* mediante attivazione in differenti salinità è riportato nella Figura 19.

Entrambi i campioni hanno avuto un andamento simile nel tempo. La fascia di salinità testata non ha dimostrato differenze sostanziali nell'andamento della motilità spermatica.

Le concentrazioni di salinità testate qui sono di accordo con gli ambienti di allevamento sostenibile di questa specie in Italia (Vincenzi et al., 2006). La vongola filippina è un organismo eurialino che sopporta una vasta amplitudine di salinità però non mantiene un'attività metabolica normale in salinità inferiore a 15‰ (Kim et al., 2001).

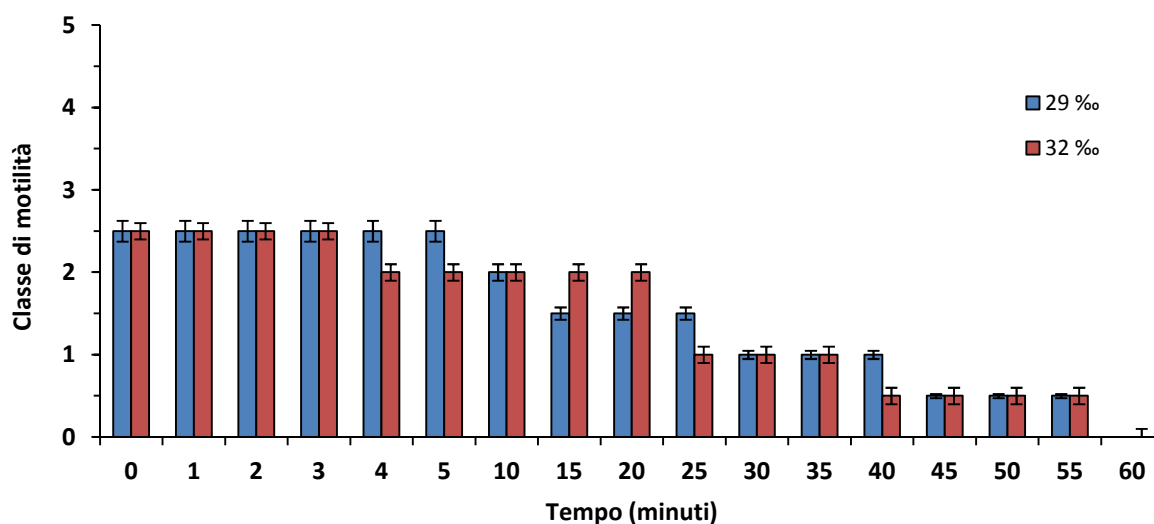


Figura 19. Confronto tra l'andamento della motilità spermatica della vongola alloctona *Tapes philippinarum* attraverso l'attivazione in acqua di mare filtrata (1:1000 V/V) in differente salinità: 29‰ e 32‰. Il seme è stato ottenuto da prelievo biotico ed attivato a temperatura 23°C e pH 8,74.

3.3.3 Le specie autoctone brasiliane

➤ *Perna perna*

Effetto del prelievo biotico e dell'emissione sulla motilità spermatica

Il confronto tra l'andamento della motilità spermatica di *Perna perna* ottenuto da prelievo biotico e da emissione indotta mediante shock termico è presentato nella Figura 20.

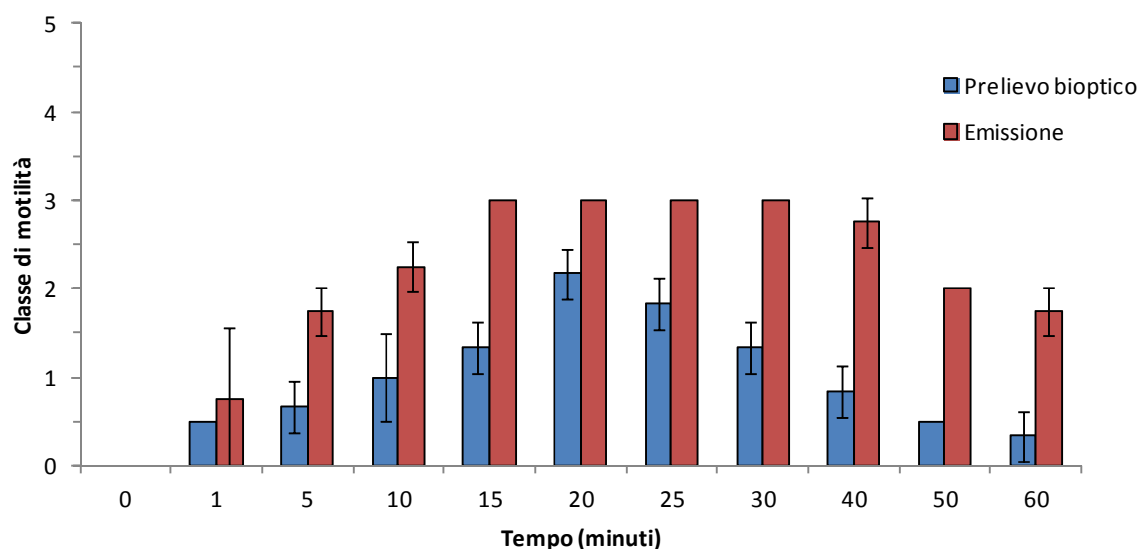


Figura 20. Andamento della motilità spermatica del seme di *Perna perna* ottenuto da prelievo biotico e emissione indotta per shock termico.

Il seme ottenuto da emissione indotta ha presentato una migliore “performance” rispetto a quello ottenuto da prelievo biotico. Questo risultato è uguale a quelli presentati per i mitili *Mytilus galloprovincialis* e *Dreissena polymorpha* (Mojares et al., 1995). La massima classe di motilità ottenuta del seme emesso è stata la classe 3,0 dopo 15 minuti ed è rimasta tale al 30° minuto. Per quanto riguarda il seme ottenuto da prelievo biotico la massima classe di motilità raggiunta è stata la classe 2,5 al 20° minuto ed è scesa a classe 2,0 al 25° minuto dopo l’attivazione.

Analisi della motilità del seme fresco

L’andamento della motilità spermatica di *Perna perna* del seme ottenuto da emissione indotta è riportato nella Figura 21.

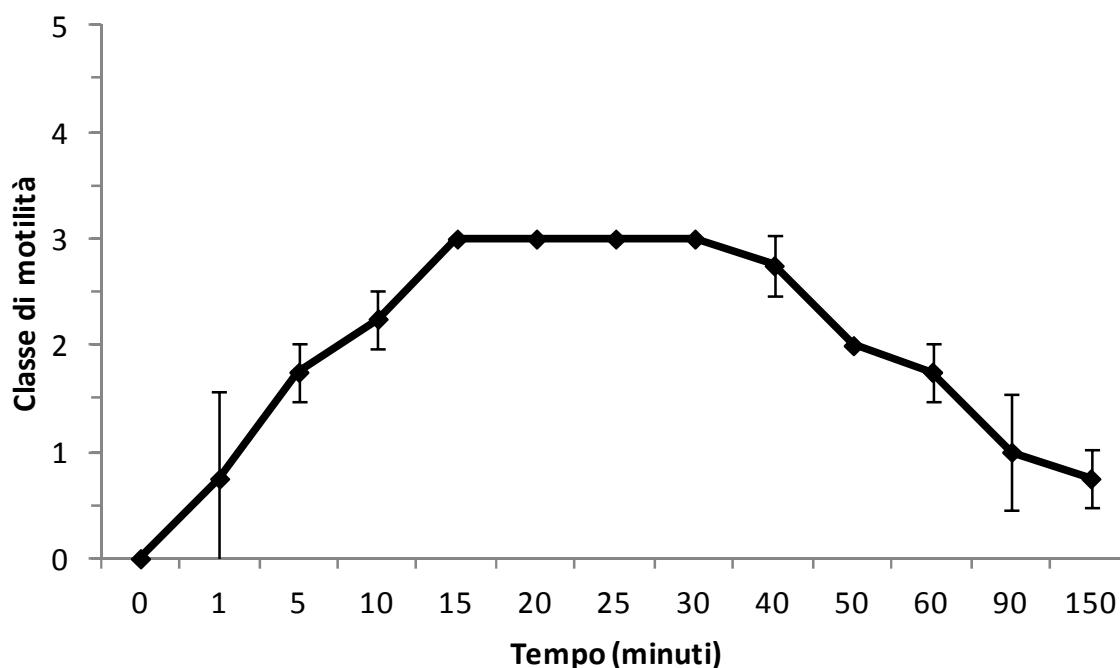


Figura 21. Andamento della motilità spermatica dal mitilo marrone *Perna perna* ottenuta da emissione indotta con attivazione in acqua di mare a temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Gli spermatozoi solo dopo 15 minuti dall’attivazione hanno raggiunto la classe 3,0 facendo durare questa intensità per oltre 20 minuti. Dopo 50 minuti dall’attivazione la motilità è ridotta alla classe 2,0 e successivamente si è attenuata fino a raggiungere classe $1,0 \pm 0,5$ al 150° minuto. In Tabella VII sono riportati i parametri fisiologici della motilità registrati nell’esperimento.

Tabella VII. Parametri fisiologici della motilità spermatica del mitilo marrone *Perna perna* mediante emissione indotta per shock termico in acqua di mare filtrata a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

| Parametro | Attivazione ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) |
|-------------------------------|--|
| Tempo di attivazione | 15' |
| Massima classe di motilità | $3,0 \pm 0,0$ |
| Durata della massima motilità | 20' |
| Durata totale della motilità | >150' |

Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a differenti regimi termici

Le aliquote di semi conservati a freddo (8°C, seme secco e in sospensione) mostrarono una buona qualità di motilità fino a 10 giorni (Figura 22). Dopo 24 ore entrambi i semi (secco e in sospensione) conservati a freddo avevano idoneità con classe superiore a 3,0. Tuttavia dopo due giorni la motilità spermatica è discesa a classe 2,5/2,0 mantenendo questo pattern fino a 7 giorni dall'inizio della conservazione a freddo. Contrariamente dopo 2 giorni i campioni conservati a temperatura ambiente (23°C, seme secco e sospeso) non esibiscono motilità spermatica.

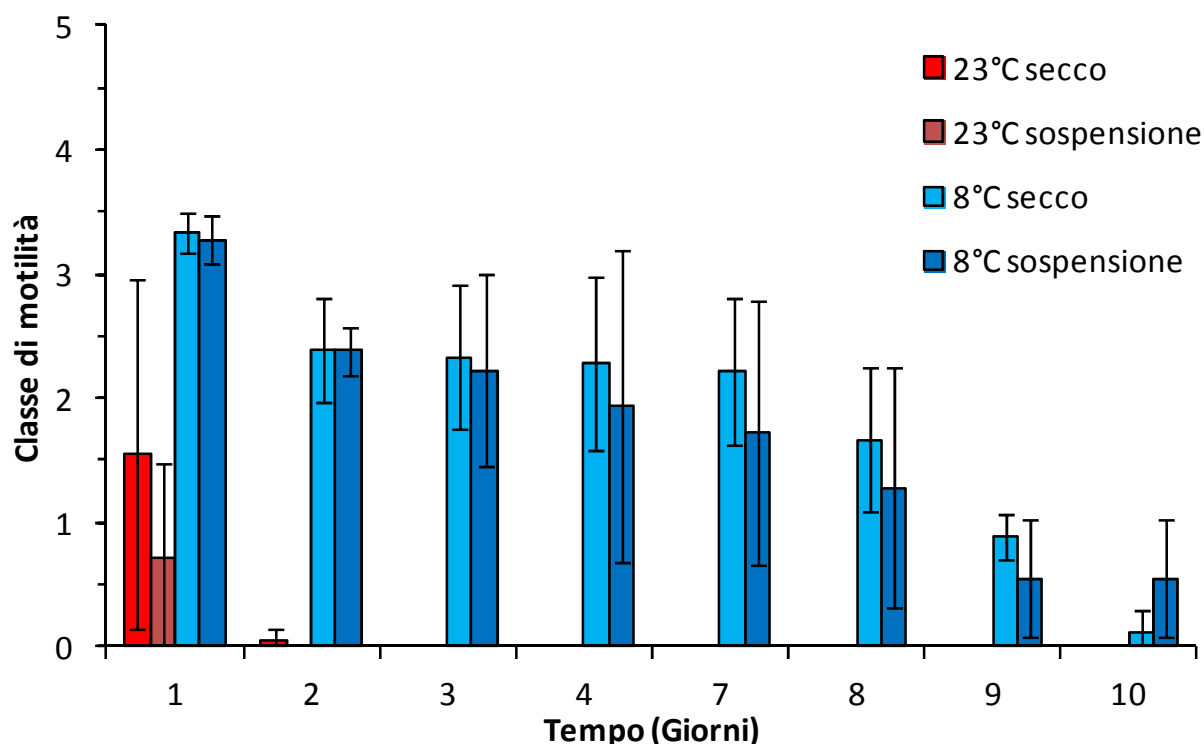


Figura 22. Motilità spermatica del mitilo marrone *Perna perna* in differenti modalità di conservazione: aliquote di seme secco e in sospensione in acqua di mare (1:50) conservate in due temperature distinte: 23°C e 8°C.

La sospensione in acqua di mare (1:50) conservata a freddo sembra non avere condizionato la motilità del seme. Questa prova ha dimostrato l'influenza positiva del freddo nella conservazione del seme di *Perna perna*. Il seme secco conservato a freddo ha infatti dimostrato la capacità di attivazione fino a 7 giorni di conservazione, mantenendo motilità classe 2,0.

Effetto della salinità sulla motilità spermatica

Il confronto tra la motilità spermatica del mitilo marrone *Perna perna* mediante attivazione in differenti salinità è riportato nella Figura 23.

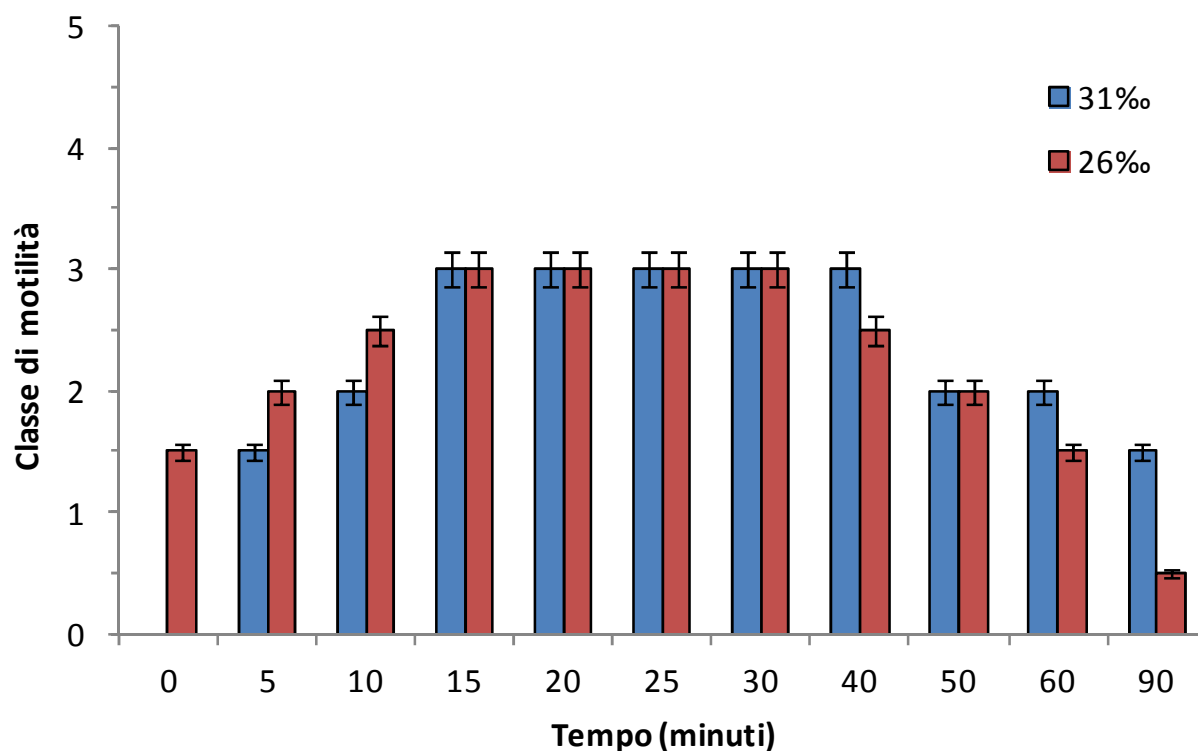


Figura 23. Effetto della salinità sull'andamento della motilità spermatica del mitilo marrone *Perna perna* mediante seme ottenuto da prelievo biotico e attivato in acqua a temperatura 25°C.

Il risultato dimostra che la salinità non influenza in modo significativo l'andamento della motilità spermatica del mitilo *Perna perna*. La salinità più bassa (26‰) sembra però avere attivato la motilità spermatica più velocemente raggiungendo la classe di motilità 1,5 già all'attivazione. Diversamente il seme sottoposto alla salinità 31‰ ha dimostrato una motilità inferiore nei primi 10 minuti uguagliando la massima classe di motilità al quindicesimo minuto. Questo andamento è stato mantenuto fino a 30 minuti dopo l'attivazione. Dopo il quarantesimo minuto il seme sottoposto alla salinità più elevata (31‰) ha dimostrato una motilità inferiore ove si è evidenziata la prima differenza significativa.

Diversi autori riportano la tolleranza di *Perna perna* alla variazione della salinità (Zuim & Mendes, 1980; Salomão et al., 1980; Zuim & Mendes, 1981; Salomão & Lunetta, 1989; Resgalla Jr. et al., 2007). Questa specie presenta un'ampia capacità di adattamento con accrescimento ottimale in salinità da 20‰ a 35‰.

➤ *Crassostrea brasiliana* (gasar)

Effetto del prelievo biotico e dell'emissione sulla motilità spermatica

Il confronto tra l'andamento della motilità spermatica di *Crassostrea brasiliana* ottenuto da prelievo biotico o da emissione indotta mediante shock termico è presentato nella Figura 24.

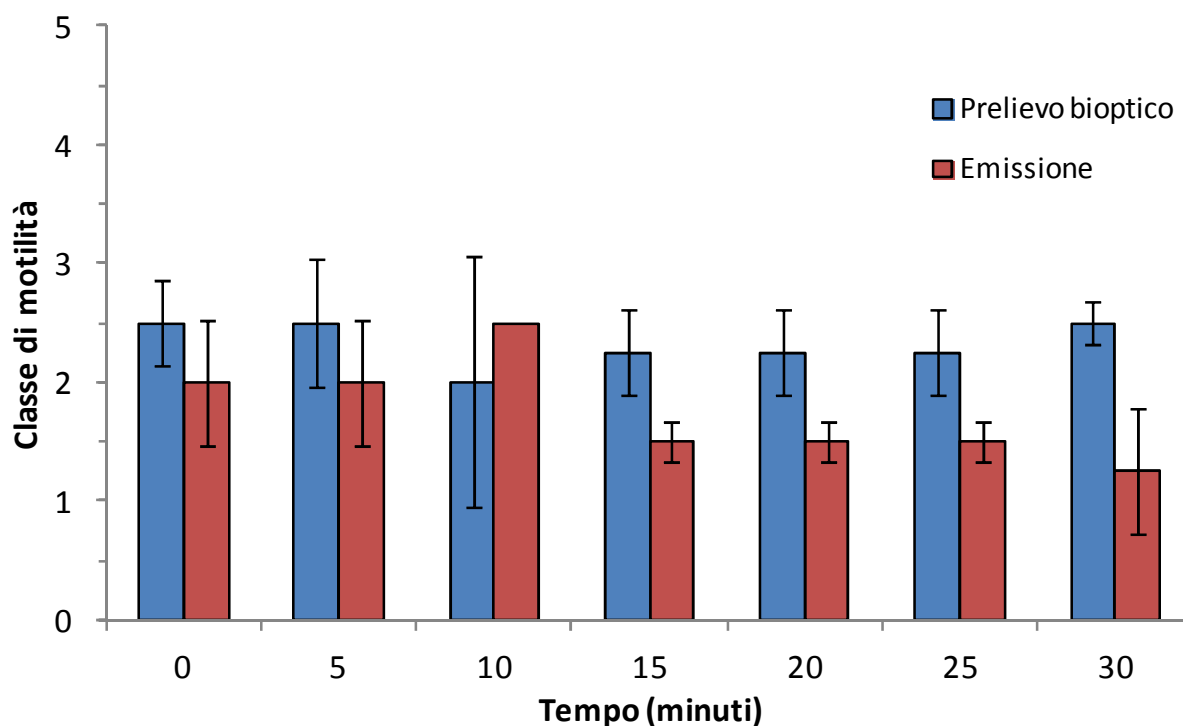


Figura 24. Andamento della motilità spermatica di *Crassostrea brasiliana* mediante prelievo bioptico ed emissione indotta per shock termico in acqua di mare a 22°C.

La massima classe di motilità ottenuta con entrambe le metodiche è stata di classe $2,5 \pm 0,5$. Tuttavia dopo 15 minuti gli spermatozoi ottenuti con emissione hanno esibito una perdita rilevante di motilità.

A differenza dell'esperimento realizzato con il seme dei mitili *M. galloprovincialis* e *P. perna* il seme ottenuto da prelievo bioptico ha presentato una migliore performance. Questo risultato si contrappone ai risultati osservati per il mitilo *Dreissena polymorpha* dove l'emissione ha dimostrato di essere la tecnica più adatta all'ottenimento di spermatozoi (Mojares et al., 1995).

Analisi della motilità del seme fresco

Conforme al risultato dell'esperimento precedente l'andamento della motilità spermatica dell'ostrica *Crassostrea brasiliana* è stato valutato nel seme ottenuto con prelievo bioptico. Il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata (1:1000 V/V) a temperatura ambiente 22°C e salinità 36‰. L'andamento della motilità è riportato nella Figura 25.

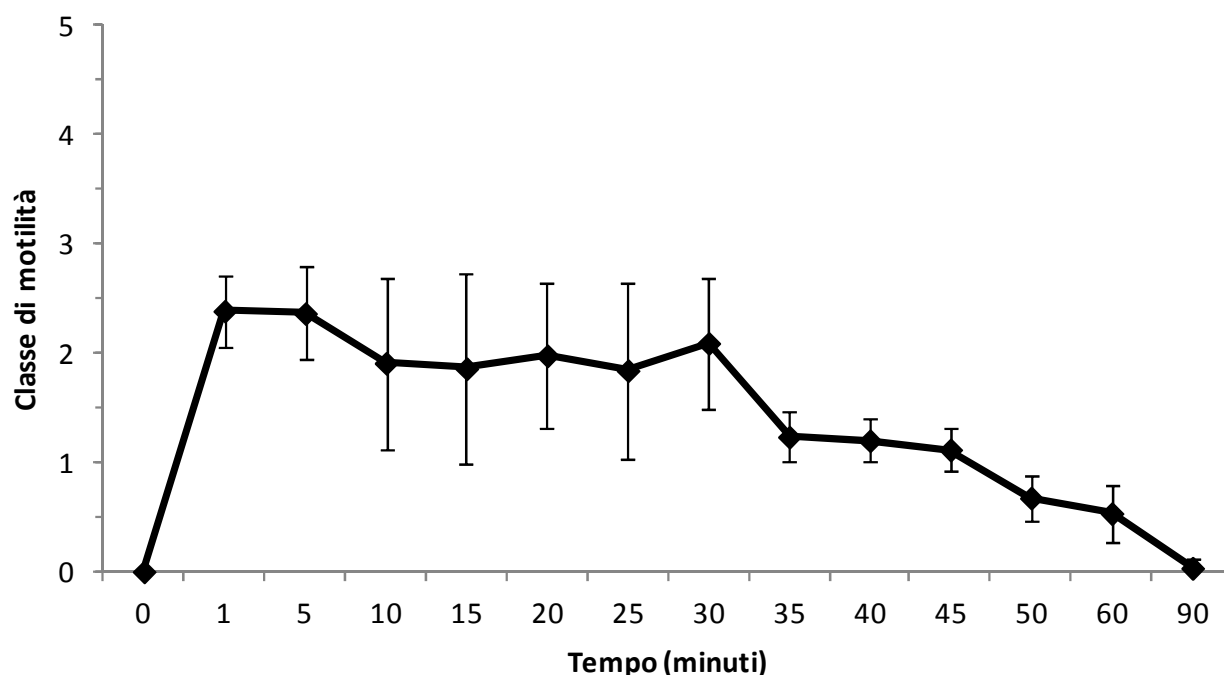


Figura 25. Andamento della motilità spermatica dell’ostrica *Crassostrea brasiliana* in acqua di mare a temperatura 22°C.

Gli spermatozoi si sono attivati dopo un minuto raggiungendo la massima classe di motilità (classe $2,5 \pm 0,5$). La massima classe di motilità degli spermatozoi di *C. brasiliana* mostra valori più bassi in confronto all’ostrica giapponese *C. gigas*. La durata della massima classe di motilità è stata mantenuta per 30 minuti confermando il risultato precedente ottenuto da Turek (2010). Tuttavia questo parametro non è stato confermato con il raggiungimento a classi di motilità più elevata. Dopo 35 minuti dall’attivazione la motilità è stata significativamente ridotta alla classe 1,5 con totale immobilità al 90° minuto.

In Tabella VIII sono riportati i parametri fisiologici della motilità spermatica di *Crassostrea brasiliana* registrati nell’esperimento.

Tabella VIII. Parametri fisiologici della motilità spermatica dell’ostrica *Crassostrea brasiliana* mediante prelievo biotico in acqua di mare filtrata a 22°C.

| Parametro | Attivazione (22°C) |
|--|--------------------|
| Tempo di attivazione | 1' |
| Massima classe di motilità | $2,4 \pm 0,4$ |
| Durata della massima motilità (≥ 3) | 0' |
| Durata totale della motilità | 90' |

Studi precedenti indicano che il periodo riproduttivo della ostrica *C. brasiliiana* nella regione sudest e sud del Brasile è quello da settembre a maggio (Absher, 1989; Pereira et al., 1991; Gomes, 2009). Anche se gli esperimenti sono stati condotti d'accordo con la stagione riproduttiva della specie (marzo ed aprile) notevoli difficoltà sono state incontrate per trovare ostriche mature. L'alta temperatura registrata in Florianópolis in estate può aver causato l'alterazione del periodo riproduttivo di *C. brasiliiana* anticipando l'emissione dei gameti nei mesi di gennaio e febbraio.

➤ *Crassostrea rhizophorae*

Analisi della motilità del seme fresco

L'andamento della motilità spermatica dell'ostrica *Crassostrea rhizophorae* del seme ottenuto con prelievo biotico è riportato nella Figura 26.

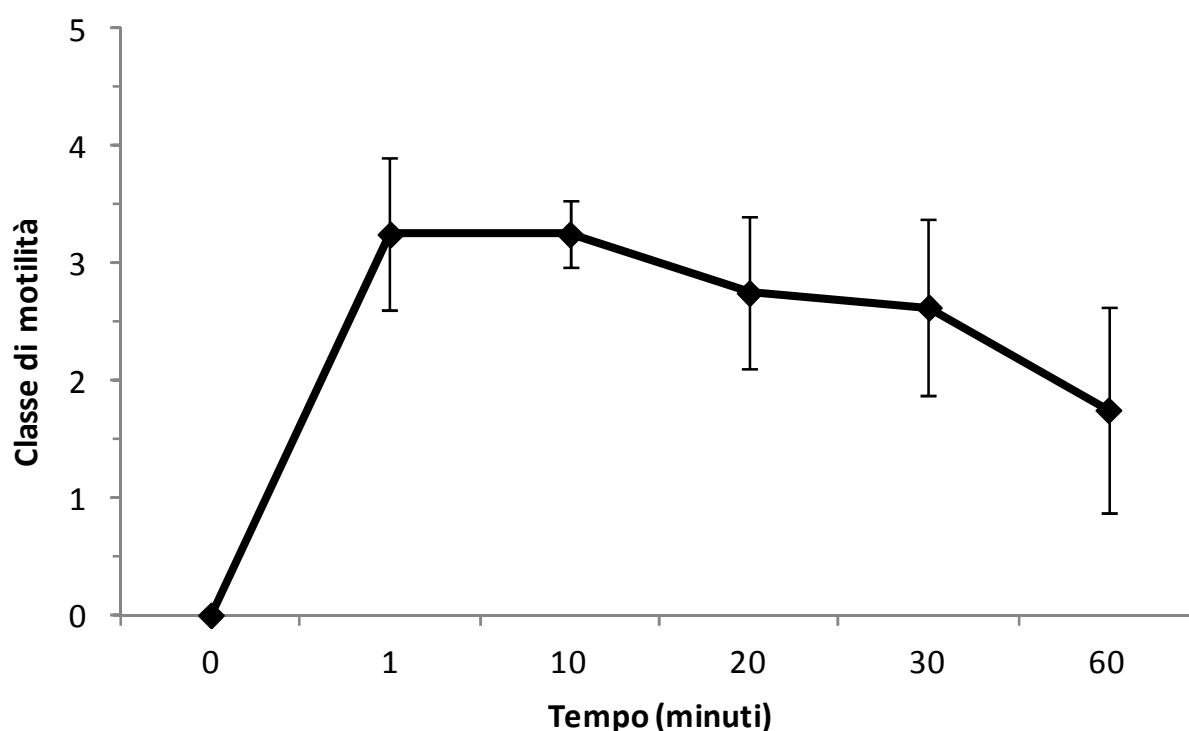


Figura 26. Andamento della motilità spermatica dell'ostrica *Crassostrea rhizophorae*. Il seme è stato ottenuto da prelievo biotico con attivazione in acqua di mare filtrata a 23°C.

Gli spermatozoi sono stati rapidamente attivi dopo uno minuto dall'attivazione raggiungendo la massima classe di motilità (classe 3,3 ± 0,7) che è stata mantenuta fino a 30 minuti. In seguito la motilità è leggermente scesa a classe 2,0 ± 1,0 al 60° minuto dopo l'attivazione. Nella Tabella IX sono riportati i parametri fisiologici della motilità spermatica di *Crassostrea rhizophorae* registrati nell'esperimento.

Tabella IX. Parametri fisiologici della motilità del seme dell'ostrica *Crassostrea rhizophorae* ottenuto con prelievo biotico e attivato in acqua di mare filtrata a 23°C.

| Parametro | Attivazione (23°C) |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 1' |
| Massima classe di motilità | 3,3 ±0,7 |
| Durata della massima motilità | 30' |
| Durata totale della motilità | > 60' |

Capacità di attivazione nel tempo di seme mantenuto a freddo

La motilità spermatica dell'ostrica *Crassostrea rhizophorae* dopo 48 ore di conservazione del seme a freddo (8°C) è riportata nella Figura 27.

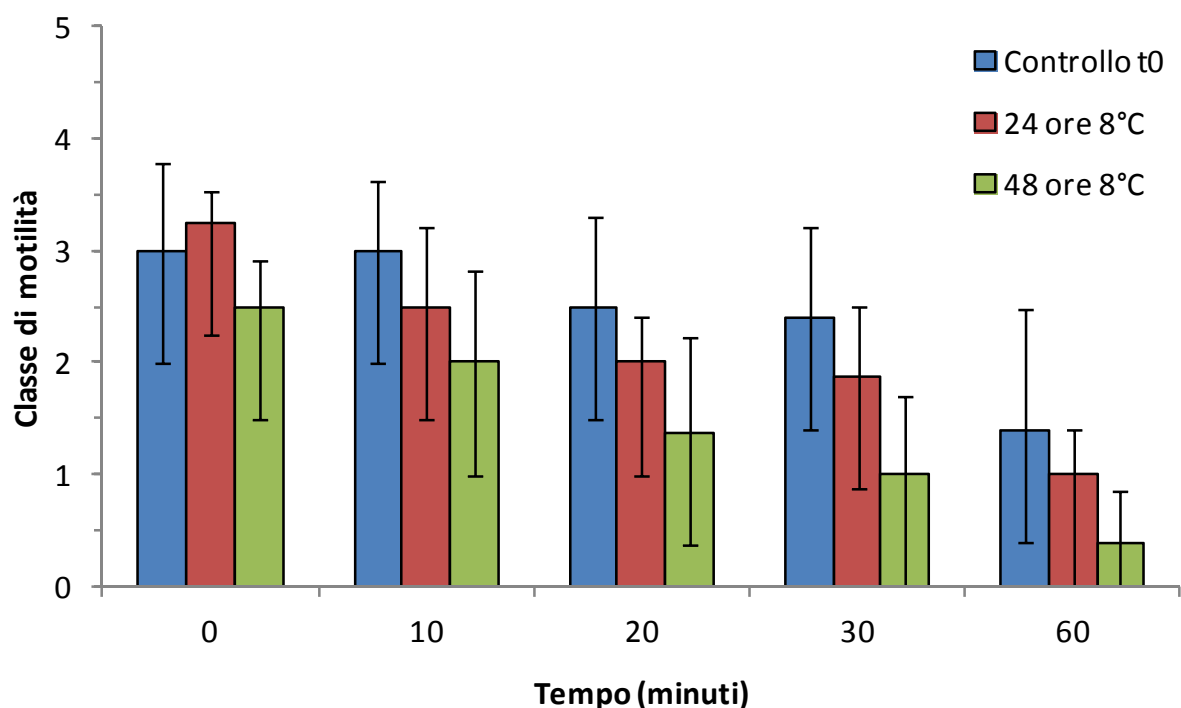


Figura 27. Motilità spermatica dell'ostrica *Crassostrea rhizophorae* mediante seme conservato a freddo (8°C) per 48 ore.

Il risultato dimostra che il seme conservato 24 ore a freddo ha avuto una performance paragonabile al controllo. Una riduzione significativa della motilità è stato osservata solo dopo 48 ore di conservazione soprattutto dopo 20 minuti dall'attivazione. Risultati paragonabili sono stati osservati per il seme di *Perna perna* ed anche per l'ostrica piatta *Ostrea edulis* (Vitiello, 2011) dove è stata evidenziata la capacità di attivazione del seme conservato a freddo.

➤ *Nodipecten nodosus*

Analisi della motilità del seme fresco

L'andamento della motilità spermatica della capasanta *Nodipecten nodosus* mediante emissione indotta per shock termico è riportato nella Figura 28.

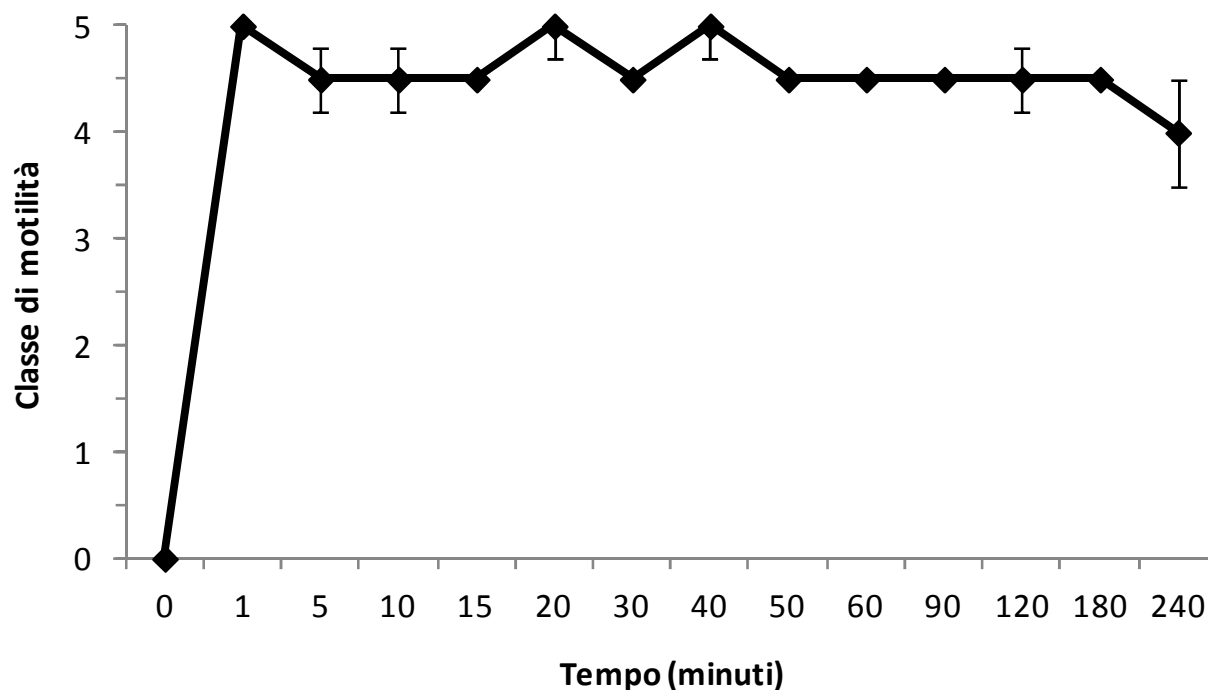


Figura 28. Andamento della motilità spermatica della capasanta *Nodipecten nodosus*. Il seme è stato ottenuto con emissione indotta per shock termico e attivato in acqua di mare filtrata a 22°C.

Gli spermatozoi si sono attivati rapidamente dopo un minuto raggiungendo la massima classe di motilità (classe 5,0) che è stata mantenuta fino a 240 minuti. Inoltre a 19 ore si è osservata la presenza di scarsi spermatozoi vibranti però senza motilità. In Tabella X sono riportati i parametri fisiologici della motilità spermatica di *Nodipecten nodosus* registrati nell'esperimento.

Tabella X. Parametri fisiologici della motilità del seme della capasanta *Nodipecten nodosus* ottenuto con emissione indotta in acqua di mare filtrata a 22°C.

| Parametro | Attivazione (22°C) |
|-------------------------------|--------------------|
| Tempo di attivazione | 1' |
| Massima classe di motilità | 5 |
| Durata della massima motilità | >240' |
| Durata totale della motilità | > 240' |

L'andamento della motilità spermatica del seme mantenuto in differenti regimi termici

Gli andamenti della motilità spermatica di *Nodipecten nodosus* ottenuti con emissione indotta mediante shock termico e mantenuti 5 ore in differenti regimi termici sono presentati nella Figura 29.

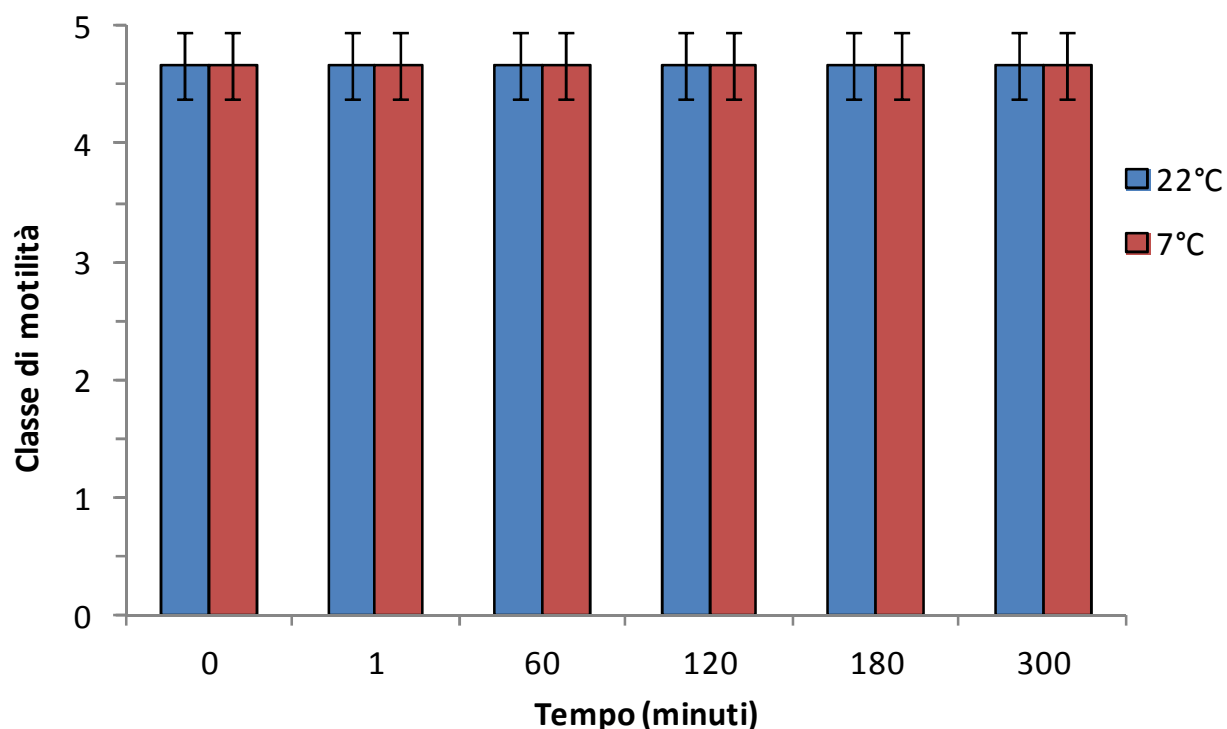


Figura 29. Motilità spermatica della capasanta *Nodipecten nodosus* del seme attivato e mantenuto per 5 ore in differenti regimi termici: 22°C e 7°C.

In questa prova non è stata osservata alcuna differenza tra i campioni mantenuti a temperatura ambiente (22°C) ed a freddo (7°). Nel 300° minuto di osservazione la motilità si è mantenuta nella classe 4,5 per tutte due le temperature. Il range termico analizzato in questo esperimento sembra non avere condizionato la motilità spermatica di *Nodipecten nodosus*.

3.4 Conclusioni

- ✓ L'acquisizione della conoscenza sull'andamento della motilità spermatica degli organismi studiati permetterà l'ottimizzazione dei protocolli di riproduzione artificiale di queste specie mediante uso del seme fresco e consentirà l'ottimizzazione dei protocolli per criopreservare il seme.
- ✓ Per quanto riguarda la motilità spermatica dei molluschi autoctoni mediterranei, *Mytilus galloprovincialis* e *Tapes decussatus* presentano le migliori "performance" in tutti i parametri fisiologici studiati soprattutto nei parametri durata della massima classe di motilità e durata totale della motilità.
- ✓ Nella gestione del seme di *M. galloprovincialis* è stato osservato che l'emissione indotta da shock termico origina spermatozoi con motilità superiore a quelli ottenuti da prelievo biotico. Tuttavia è stata osservata una migliore motilità complessiva dopo conservazione a freddo per 24 ore del seme secco ottenuto con prelievo biotico.
- ✓ L'ostrica giapponese *Crassostrea gigas* presenta una motilità spermatica superiore alla vongola alloctona *Tapes philippinarum* in tutti i parametri fisiologici analizzati. Per entrambe le specie la conservazione del seme a freddo ha influenzato negativamente la motilità spermatica.
- ✓ Il risultato raggiunto nell'esperimento svolto con il riccio *Paracentrotus lividus* ha dimostrato la variabilità del materiale biologico che in questo caso ha mostrato buona motilità solo per 75 minuti; in genere tali performance sono superiori. Di qui la necessità di poter riuscire a criopreservare tale sistema biologico.
- ✓ Per quanto riguarda i molluschi autoctoni brasiliani, la capasanta *Nodipecten nodosus* ha esibito una motilità spermatica molto superiore alle altre specie studiate. Viceversa l'ostrica *Crassostrea brasiliensis* ha dimostrato bassi valori dei parametri fisiologici considerati. Nella gestione del seme di questi molluschi è stata osservata la possibilità di conservazione a freddo del seme secco di *Perna perna*, *Crassostrea rhizophorae* e *Nodipecten nodosus*, in particolare *Perna perna* in cui il seme presenta buone performance anche dopo 7 giorni di conservazione.

3.5 Bibliografia

- Absher, TM. Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná: desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 1989
- De la Roche JP, Marín B, Freitas L, Vélez A (2002) Embryonic development and larval and post-larval growth of the tropical scallop *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *nodosus* (L. 1758) (Mollusca: Pectinidae). *Aquac Res* 33:819-827.
- Del Prete F, Silvestri F, Rinna F, Vitiello V, Langellotti AL, Barone CMA, Sansone G. Sperm motility of three mediterranean bivalve molluscs. *World Aquaculture 2011: Book of Abstracts*, Natal, Brazil, 2011.
- Di Matteo O, Langellotti AL, Masullo P, Sansone G (2009) Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology* 58:145-150.
- Fabbrocini A, Lubrano-Lavadera S, Rispoli S, Sansone G (2000) Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40:46-53.
- Fabbrocini A, D'Adamo R (2009) Attivazione della motilità in spermatozoi di vongola *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Biol Mar Mediterr* 16:226-227.
- Gago J, Luís OJ (2011) Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock. *Aquacult Int* 19:181-191.
- Gomes, CAM. Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório. Dissertação de Mestrado em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009
- Ieropoli S, Masullo P, Espirito Santo M, Sansone G (2004) Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49:250-257.
- Kim WS, Huh HT, Huh SH, Lee TW (2001) Effects of salinity on endogenous rhythm of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mar Biol* 138:157-162.
- Lombardi, E. Criobiologia di Spermatozoi di *Paracentrotus lividus*. Tesi di Laurea Sperimentale in Fisiologia dello Stress in Ambiente Acquatico. Università degli Studi di Napoli Federico II, Facoltà di Scienze MM. FF. NN., 2006

- Lunetta JE (1969) Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* – *Mollusca: Lamellibranchia*). Bol Zool Bio Mar 26:33-111.
- Mojares JJ, Stachecki JJ, Kyojuka K, Armant DR, Ram JL (1995) Characterization of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) sperm morphology and their motility prior to and after spawning. J Exp Zool 273:257-263.
- Pereira OM, Galvão MSN, Tanji S (1991) Época e método de seleção de sementes de ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck 1819) no complexo estuarino-lagunar de Cananéia, Estado de São Paulo (25°S; 48°W). Bol Inst Pesca 18:41-49.
- Resgalla Jr. C, Brasil ES, Salomão LC (2007) The effect of temperature and salinity on the physiological rates of the mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758). Braz Arch Biol Technol 50:543-556.
- Rupp GS, Poli CR(1994) Spat production of the sea scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758), in the hatchery: initial studies in Brazil. Can Tech Rep Fish Aquat Sci 2:91-96.
- Salomão LC, Magalhães ARM, Lunetta JE (1980) Influência da salinidade na sobrevivência de *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Bol Fisiol Animal USP 4:143-152.
- Salomão LC, JE Lunetta (1989) The effects of salinity changes on the osmotic ionic concentrations in the hemolymph of *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Bol Fisiol Animal USP 13:29-38.
- Sühnel S, Lagreze F, Bercht M, Ferreira JF, Carneiro-Schaefer AL, Magalhães, Maraschin M(2010) Sexual stages of the female portion in the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758) and astaxanthin quantity in each stage. Braz J Biol 70:651-658.
- Turek, CR. Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsídio ao cultivo. Tese de Doutorado em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010
- Vincenzi S, Caramori G, Rossi R, De Leo GA (2006) A GIS-based habitat suitability model for commercial yield estimation of *Tapes philippinarum* in a Mediterranean coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy). Ecol Model 193:90-104.
- Vitiello, V. Applicazioni criobiologiche in acquacoltura e nella gestione delle risorse idrobiologiche. Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari. Università degli Studi di Napoli Federico II, 2011
- Zuim SMF, Mendes EG (1980) Tolerância de *Perna perna* e *Brachidontes solisianus* a diferentes salinidades. Rev Bras Biol 40:137-141.

Zuim SMF, Mendes EG (1981) A influência da salinidade na taxa respiratória de dois mexilhões, *Perna perna* e *Brachidontes solisianus* (Mollusca: Bivalvia). Rev Bras Biol 41:57-61.

3.6 Progettazione ed ottimizzazione di protocolli di criopreservazione per spermatozoi di specie acquacolturali

3.7 Materiali e Metodi

In questa fase sperimentale è stata studiata la criopreservabilità del seme del riccio mediterraneo *Paracentrotus lividus* e dei molluschi alloctoni brasiliani *Perna perna*, *Crassostrea brasiliana* e *Nodipecten nodosus*. L'ottenimento e la gestione del seme sono stati fatti in base alla fase sperimentale precedente di acquisizione di conoscenze, ove per ciascuna specie sono state individuate le migliori condizioni.

La valutazione qualitativa degli spermatozoi è stata effettuata analizzando la motilità spermatica, espressa in classi (da 0 a 5), in base alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL), secondo la correlazione proposta da Fabbrocini et al. (2000).

➤ *Paracentrotus lividus*

Ottimizzazione del protocollo di adattamento/raffreddamento

Basati nei risultati ottenuti da Lombardi (2006) e Vitiello (2011) sono state fatte prove per l'ottimizzazione del protocollo di adattamento/raffreddamento. Prove sono stati condotti con animali allevati in acquario (ma non a circuito chiuso) e selvatici. Sono stati sperimentati diversi agenti crioprotettivi anche in miscele con diverse concentrazioni, diverse temperature e periodi di adattamento, congelamenti in due tipologie di contenitori con numerose curve di congelamento. Le diverse condizioni sperimentali testate sono descritte nella Tabella XI.

Tabella XI. Condizioni sperimentali utilizzati nelle prove di criopreservazione del seme di *Paracentrotus lividus*.

| Origini degli animali: | Mantenuti in acquario (<i>S.Z. Anton Dohrn</i>) e | | | | | Ottenuti dalla pesca (<i>Sorrento</i>) | | |
|----------------------------|---|-----|---------------------|------|-----------------------|--|--------------------------|---------------|
| Crioprotettivi provati: | DMSO; | EG; | PG; | GLY; | MET; | DMSO+ GLY; | DMSO +GLY+ MET; | DMSO+ GLY+ EG |
| Concentrazioni analizzate: | 1,5%; | 3%; | 4%; | 5%; | 6%; | 7%; | 8%; | 10% |
| Prove di adattamento: | temperatura ambiente | | | e | | freddo | | |
| Periodo di adattamento: | 0 - 20 minuti | | | | | | | |
| Materiale di congelamento: | paillettes 250 µl | | | e | | nuncs 2ml | | |
| Gradienti di congelamento: | molto lento; (<5°C/min) | | lento; (5-10°C/min) | | rapido; (10-30°C/min) | | molto rapido (>30°C/min) | |

Per le prove di congelamento gli spermatozoi inattivi, addizionati con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati sono stati sottoposti a differenti gradienti di congelamento, fino a -70°C . Al raggiungimento di -70°C le paillettes/nuncs sono state immerse in azoto liquido. Gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di $15^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ed analizzati per valutarne la classe di motilità.

Per la valutazione della motilità aliquote di spermatozoi inattivi sono stati diluite 1:1000 in soluzioni di acqua di mare filtrata. La motilità è stata osservata e filmata al microscopio e valutata da 3 operatori indipendenti in classe di motilità (Fabbrocini et al., 2000).

➤ *Perna perna*

Selezione degli agenti crioprotettivi

Aliquote di spermatozoi inattivi sono state diluite 1:100 in soluzioni di acqua di mare contenenti concentrazioni crescenti di agenti crioprotettivi. Le concentrazioni finali (V/V) testate sono state:

- DMSO: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- EG: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- PG: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- GLY: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- MET: 4%, 6%, 8%

L'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente di $22,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e dopo tempi di esposizione di 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minuti aliquote di seme trattato sono state attivate per valutarne la classe di motilità.

Come controllo sono stati considerati spermatozoi incubati in acqua di mare in assenza di crioprotettivi alla stessa temperatura di incubazione.

Per le fasi sperimentali successive sono state selezionate le concentrazioni che hanno fatto registrare le minori perdite di motilità spermatica rispetto al controllo.

Prove di congelamento

Gli spermatozoi inattivi, addizionati con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati secondo la fase sperimentale precedente, sono stati sottoposti a due gradienti di congelamento ($-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-5.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), fino a -70°C . In questa fase l'adattamento è stato fatto per 15 minuti a temperatura ambiente (22°C) in nunc da 2 ml. Al raggiungimento della temperatura indicata, i nunc contenenti spermatozoi sono state immersi in azoto liquido.

Posteriormente gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino ad una temperatura di 20°C ed analizzati per valutarne la classe di motilità.

➤ *Crassostrea brasiliana* (gasar)

Selezione degli agenti crioprotettivi

Aliquote di spermatozoi inattivi sono state diluite 1:100 in soluzioni di acqua di mare contenenti concentrazioni crescenti di agenti crioprotettivi. Le concentrazioni finali (V/V) testate sono state:

- DMSO: 5%, 7%, 10%, 15%
- EG: 5%, 7%, 10%, 15%
- PG: 5%, 7%, 10%, 15%
- GLY: 5%, 7%, 10%, 15%
- MET: 4%, 6%, 8%

L'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente di 22°C e dopo i tempi di esposizione di 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minuti, aliquote di seme trattato sono state attivate in acqua di mare per valutarne la classe di motilità.

Come controllo sono stati considerati spermatozoi incubati in acqua di mare in assenza di crioprotettivi alla stessa temperatura di incubazione.

Per le fasi sperimentali successive sono state selezionate le concentrazioni che hanno fatto registrare le minori perdite di motilità spermatica rispetto al controllo.

Prove di congelamento

Gli spermatozoi inattivi, addizionati con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati secondo la fase sperimentale precedente, sono stati sottoposti a cinque gradienti di congelamento (-5°C/min, -8,5°C/min, -9°C/min, -11,5°C/min e -21°C/min), fino a -70°C. In questa fase l'adattamento è stato fatto per un periodo di 10 minuti a temperatura ambiente (22°C) in nunc da 2ml. Al raggiungimento della temperatura indicata, i nunc contenenti spermatozoi sono state immersi in azoto liquido.

Posteriormente gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di 60°C/min fino ad una temperatura di 20°C ed analizzati per valutarne la classe di motilità.

➤ *Nodipecten nodosus*

Selezione degli agenti crioprotettivi

Aliquote di spermatozoi ottenute da emissione per shock termico sono state diluite in soluzioni di acqua di mare contenenti concentrazioni crescenti di agenti crioprotettivi (80×10^6 spz/ml). Le concentrazioni finali (V/V) testate sono state:

- DMSO: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- EG: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- PG: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- GLY: 3,5%, 5%, 7%, 10%, 15%
- MET: 4%, 6%, 8%

L'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente di 22°C e dopo i tempi di esposizione di 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minuti, aliquote di seme trattato sono state attivate in acqua di mare per valutarne la classe di motilità.

Come controllo sono stati considerati spermatozoi incubati in acqua di mare in assenza di crioprotettivi alla stessa temperatura di incubazione.

Per le fasi sperimentali successive sono state selezionate le concentrazioni che hanno fatto registrare le minori perdite di motilità spermatica rispetto al controllo.

Prove di congelamento

Aliquote di spermatozoi addizionati con acqua di mare contenente i crioprotettivi selezionati nella fase sperimentale precedente sono state sottoposte a cinque gradienti di congelamento (-7,5°C/min, -6,1°C/min, -9,9°C/min, -11,2°C/min e -24°C/min), fino a -70°C. In questa fase l'adattamento è stato fatto per 10 minuti a temperatura ambiente (22°C) in nunc da 2 ml. Al raggiungimento della temperatura indicata, i nunc contenenti spermatozoi sono stati immersi in azoto liquido.

Posteriormente gli spermatozoi sono stati scongelati con un gradiente di 60°C/min fino ad una temperatura di 20°C ed analizzati al microscopio ottico (x200) per valutarne la classe di motilità.

Effetto dell'addizione di glicina all'extender di criopreservazione

Dopo avere individuato i crioprotettivi più efficaci per il congelamento è stato provato l'effetto dell'addizione di glicina come adiuvante crioprotettivo allo 0,6%. In questo modo è stato fatto un confronto tra due tipologie di protocollo utilizzando lo stesso gradiente.

3.8 Risultati e Discussioni

➤ *Paracentrotus lividus*

Selezione degli agenti crioprotettivi e prove di congelamento

Nella Tabella XII sono delineate tutte le fasi dei 13 esperimenti realizzati e la sintesi dei migliori risultati ottenuti.

Tabella XII. Condizioni sperimentali utilizzati nelle esperimenti di criopreservazione di seme del riccio *Paracentrotus lividus* e la sintesi dei risultati ottenuti. Nella colonna “Risultati” la lettera A rappresenta l’adattamento e la S lo scongelamento.

| Esperimento | Provenienza | Classe partenza | Condizioni | Crioprotettivi | Adattamento | Curve congelamento | Risultati (classe di motilità) |
|-------------------|------------------------|-----------------|---------------------|--|-----------------------------------|---|---|
| N 1 (12 -11-2010) | Acquario SZN | 2,5 | Nunck | DMSO 7%, MET 7%, EG 7%, GLY 7% | Temperatura ambiente | 1) 5,6 °C/min 2) 8,2 °C/min | A: tutti classe 0 |
| N2 (14-12-2010) | Pesca | 3,5 | Nunck | DMSO 7% , EG 7% MET 7%, GLY 7% | Temperatura ambiente 0 -10 min | 11,2 °C/min | A: DMSO 7 % 10 min (2,5) S: DMSO 7% (0,5) |
| N3 (16-12-2010) | Pesca | 4,0 | Nunck | GLY 7% , DMSO 5% -7%, EG 7% | Temperatura ambiente | 45 °C/min | A: DMSO 5% 7% (3,0) S: DMSO 7% GLY 5% (0,5) |
| N4 (18-01-2011) | Pesca (Stand-by) | 4,0 | Paillettes | DMSO 5- 7%, GLY 5- 7% | Temperatura ambiente | 30 °C/min | A: DMSO 5% 7% (3,0) S: DMSO 5% 7% (0,5) |
| N5 (19-01-2011) | Acquario (Stand-by) | 4,0 | Paillettes | DMSO 5%, 7% | Temperatura ambiente 10 min | 1) 31 °C/min 2) 36,8 °C/min 3) 61,3 °C/min | A: DMSO 7% (2,5) S: DMSO 7% curve 3 (1,5/2,0) |
| N6 (23-02-2011) | Acquario SZN | 4,0 | Paillettes | DMSO 1,5 -3%, EG 1,5- 3% , MET 1,5-3%, GLY 1,5-3%, PG 1,5-3% | Temperatura ambiente 10-20 min | 1) 67,7 °C/min 2) 78,9 °C/min 3) 110 °C/min | A: DMSO 1,5% MET 1,5% S: tutti classe 0 |
| N7 (24-02-2011) | Acquario SZN | 3,5/4,0 | Paillettes | DMSO 5-7%, GLY 5-7%, MET 6-8% | Temperatura ambiente 1-8 min | 1) 110 °C/min 2) 25,7°C/min 3) 90 °C/min | A: MET 6% 2min (3) S: DMSO 7% (0,5) |
| N8 (08-03-2011) | Acquario SZN | 2,2 | Paillettes | DMSO 4%, DMSO+GLY 3,5%, DMSO+GLY+MET 2% | Temperatura ambiente 10 min | n.a. | A: DMSO 3,5% +GLY 3,5% (0,5) |
| N9 (15-03-2011) | Acquario SZN | 3,5/4,0 | Nunck | DMSO 4% GLY 3,5+DMSO 3,5% GLY1,5+DMSO1,5+EG1,5% | Temperatura ambiente 10-20 min | 1) 130 °C/min 2) 112°C/min 3) 79 °C/min | A: GLY 1,5+DMSO 1,5 +EG 1,5% 10 min (1,0) S: tutti classe 0 |
| N10 (16-03-2011) | Acquario SZN | 3,0 | Nunck | DMSO 5-7-8-10-15 % | Temperatura ambiente | 60 °C/min | A: DMSO 7% 10% (0,5) S: tutti classe 0 |
| N11 (21-03-2011) | Acquario SZN | 3,0 | Nunck Paillettes | DMSO 6- 8%, GLY 6- 8% | Freddo (7°C) 5-10 min | 1) 34,3 °C/min 2) 58,9°C/min 3) 34,8 °C/min | A: DMSO 8% 10 min (1,0) S: DMSO 8% nunck curva 1 (≥0,5) |
| N12 (14-04-2011) | Acquario SZN | 5,0 | Nunck | DMSO 3-5-7-10 % | Temperatura ambiente | 1) 72,0 °C/min 2) 15,5 °C/min | A: n.a. S: DMSO 7% e 10% (≥0,5) |
| N13 (02-05-2012) | Acquario SZN | 4,5 | Nunck Paillettes | DMSO 5-7-10 % | Temperatura ambiente 5 min | n.a. | A: DMSO 5% (1,5) |

Il miglior risultato è stato ottenuto con adattamento di 10 minuti a temperatura ambiente e crioprotettivo DMSO 7%. Infatti il seme con classe 4,0 all’attivazione è passato a classe 2,5 nella fase di precongelamento, ed allo scongelamento si ha mostrato classe 1,5/2,0. In precedenti sperimentazione di altri operatori, allo scongelamento erano attivi solo spermatozoi appena motili *in loco* (Figura 30).

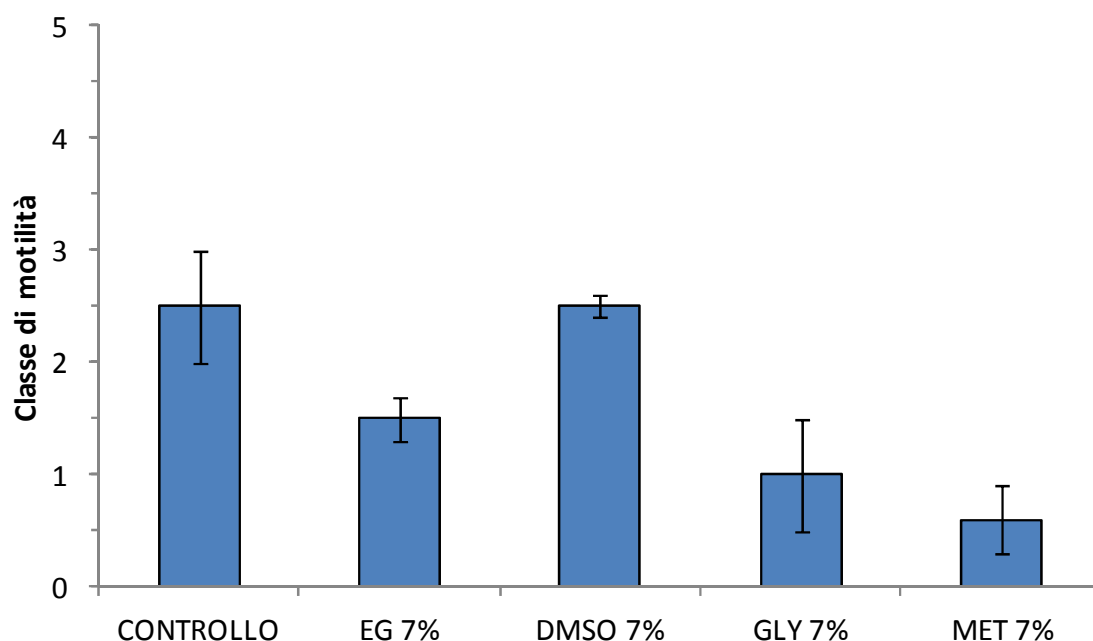


Figura 30. Adattamento di seme di *Paracentrotus lividus* esposto ai differenti CPA (DMSO, EG, GLY, MET) a temperatura ambiente (18°C) per 10 minuti.

In questa fase il DMSO 7% si è evidenziato come il crioprotettivo meno tossico mentre il metanolo 7% è stato considerato il più tossico. Nonostante la tossicità osservata tutti i crioprotettivi testati sono stati utilizzati per la fase successiva.

Nella prova di congelamento il seme è stato congelato in paillettes da 250 µl mediante tre gradienti distinti: -31°C/min, -61,3°C/min e -37°C/min (Figura 31).

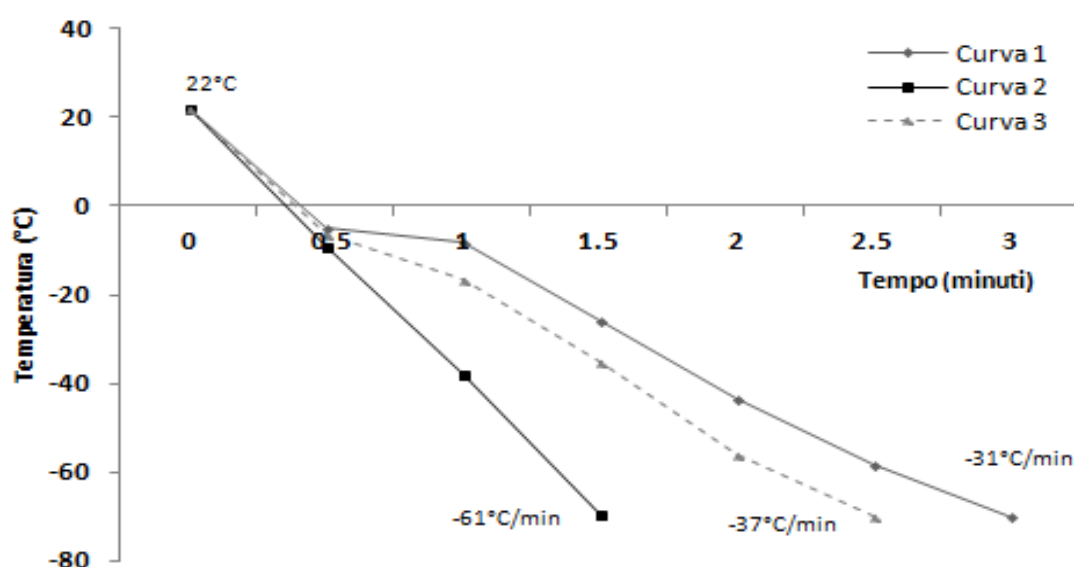


Figura 31. Curve di congelamento impiegate per le prove di criopreservazione del seme di *Paracentrotus lividus*.

Il gradiente più rapido (-61°C/min) è risultato essere il migliore, con una motilità classe 1,5/2,0 dopo scongelamento mediante utilizzo di DMSO 7%. I crioprotettivi etilen glicole, glicerolo e metanolo non hanno presentato nessun tipo di protezione efficace ai danneggiamenti provocati per le basse temperature (Tabella XIII).

Tabella XIII. Risultato del congelamento di seme di *Paracentrotus lividus* dopo adattamento di 10 minuti a 18°C ai differenti CPA a seguito di congelamento con vapori di azoto liquido in tre gradienti distinti, -31 °C/min, -61 °C/min e -37°C/min. I risultati sono espressi in classe di motilità dopo scongelamento.

| CPA (%) | DMSO 5 | DMSO 7 | EG 7 | GLY 7 | MET 7 |
|--------------------------------------|--------|---------|------|-------|-------|
| Congelamento 1 (-31°C/min) | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 0 |
| Congelamento 2 (-61°C/min) | na | 1,5/2,0 | 0 | 0 | 0 |
| Congelamento 3 (-37°C/min) | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 |

Effettivamente la criopreservazione di seme di questa specie di riccio si presenta particolarmente difficile in confronto agli altri organismi marini studiati. Sono limitati gli studi che riportano il successo della criopreservazione del seme di questi echinodermi e soltanto per ricci del genere *Strongylocentrotus* (Asahina & Takahashi, 1977; Asahina & Takahashi, 1978; Asahina & Takahashi, 1979) e *Tetrapigus* (Barros et al., 1996; Barros et al., 1997). Per quanto riguarda *Paracentrotus lividus* soltanto il congelamento di embrioni ha avuto delle risultato tangibili (Paredes & Bellas, 2009; Bellas & Paredes, 2011). Differentemente gli spermatozoi di *P. lividus* si sono rivelati un sistema estremamente delicato e di difficile criopreservabilità (Vitiello, 2011).

Nonostante tutto, i risultati ottenuti da queste esperimenti dimostrano un considerevole sviluppo rispetto alle prove precedenti condotte da Lombardi (2006) in cui è stato individuato in ugual modo il DMSO come CPA più effettivo però con scarssissima motilità spermatica dopo scongelamento del seme (classe <0,5).

➤ *Perna perna*

Selezione degli agenti crioprotettivi

Sono riportati in Figura 32 i valori di motilità spermatica registrati negli esperimenti di tossicità realizzati con seme di *Perna perna* incubato a temperatura ambiente ($22,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) in presenza dei CPA dimetilsolfossido, etilen glicole, propilen glicole, glicerolo e metanolo.

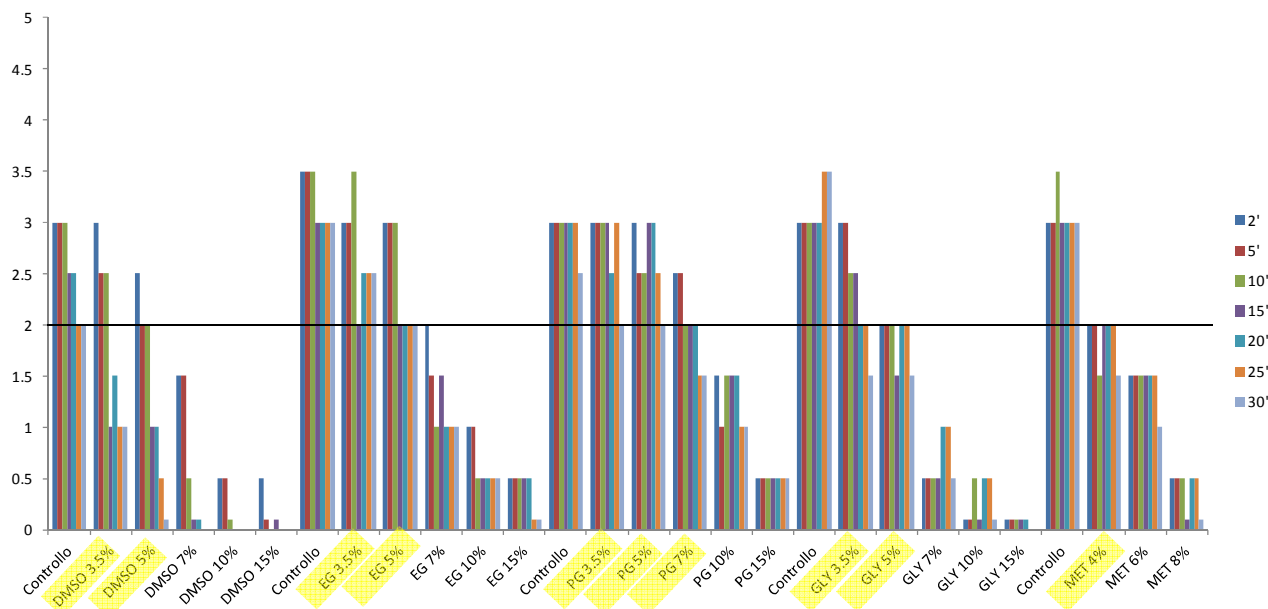


Figura 32. Adattamento del seme di *Perna perna* esposto in differenti concentrazione di CPA (DMSO, EG, PG, GLY, MET) a temperatura ambiente ($22,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$).

In generale tutti i crioprotettivi si sono dimostrato tossici per gli spermatozoi di *Perna perna* dopo 30 minuti di incubazione, inducendo la riduzione della motilità spermatica rispetto al controllo. È stata evidenziata una notevole riduzione della motilità spermatica mediante l'aumento della concentrazione dei CPA. In questo caso la permanenza per più di 5 minuti in classe di motilità superiore alla classe 2,0 è stata utilizzata come riferimento per la selezione dei CPA meno tossici. I CPA selezionati e potenzialmente utilizzabili per il congelamento sono stati: DMSO 3,5% e 5%; EG 3,5% e 5%; PG 3,5%, 5% e 7%; GLY 3,5% e 5%; MET al 4%.

DMSO, EG e PG alle concentrazioni 5% e 7% erano stati individuati i CPA meno tossici per il seme del mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis* (Di Matteo et al., 2009). Tuttavia per il mitilo australiano *Perna canaliculus* il DMSO in concentrazione superiore a 12% è stato individuato come agenti crioprotettivi più efficace (Smith et al., 2012).

Prove di congelamento

La Figura 33 riproduce le due curve di congelamento testate nelle prove di criopreservazione del seme di *Perna perna*.

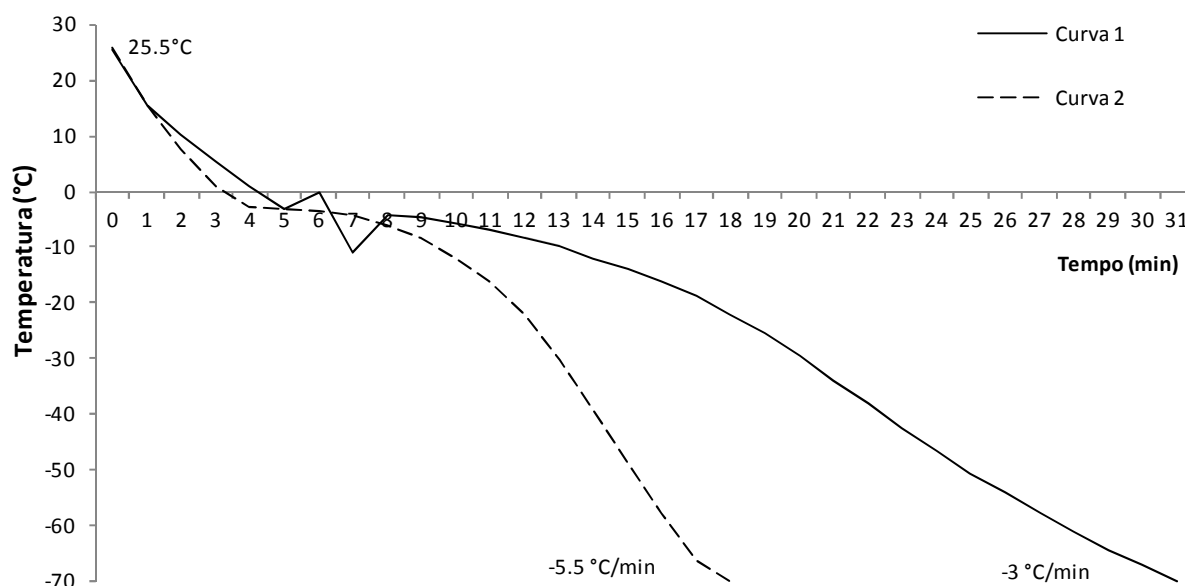


Figura 33. Curve di congelamento impiegate per le prove di criopreservazione del seme di *Perna perna*.

Dopo lo scongelamento del seme incubato con le differenti concentrazioni di CPA il miglior risultato è stato ottenuto con la curva 2 con gradiente di congelamento $-5,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ove sono stati osservati spermatozoi motili (Tabella XIV).

Tabella XIV. Risultato degli esperimenti di congelamento di seme di *Perna perna* dopo adattamento di 15 minuti a 22°C ai differenti CPA a seguito di congelamento con vapori di azoto liquido in due gradienti distinti, $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-5,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. I risultati sono espressi in classe di motilità e le crocette indicano la vibrazione degli spermatozoi dopo scongelamento.

| CPA (%) | EG 3,5 | EG 5 | DMSO 3,5 | DMSO 5 | PG 3,5 | PG 5 | PG 7 | PG 10 | GLY 3,5 | GLY 5 | MET 4 |
|--|--------|------|----------|--------|--------|------|------|-------|---------|-------|-------|
| Congelamento 1 $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ | | + | | | | | + | + | | | |
| Congelamento 2 $-5,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ | + | + | + | | | | + | + | | | |

Entrambe le curve testate non hanno permesso la sopravvivenza di spermatozoi. Per quanto riguarda il gradiente di congelamento, Di Matteo et al. (2009) osservarono una vigorosa motilità spermatica di *Mytilus galloprovincialis* dopo scongelamento impiegando un gradiente di circa $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Analogamente nel protocollo di criopreservazione del seme di *Perna canaliculus*, Smith et al. (2012) osservarono che il gradiente di congelamento $-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ è stato il più efficiente.

I migliori risultati sono stati ottenuti mediante utilizzo di EG 5%, PG 7% e 10% rivelando spermatozoi dotati di vibrazione nelle due curve. Il DMSO 5%, il MET 4%, il PG e GLY 3,5% e 5% non dimostrarono una protezione efficace contro i danneggiamenti cellulari da processo di congelamento.

➤ *Crassostrea brasiliana* (gasar)

Selezione degli agenti crioprotettivi

Sono riportati in Figura 34 i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme a temperatura ambiente (22°C) in presenza dei CPA dimetilsolfossido, etilen glicole, propilen glicole, glicerolo e metanolo.

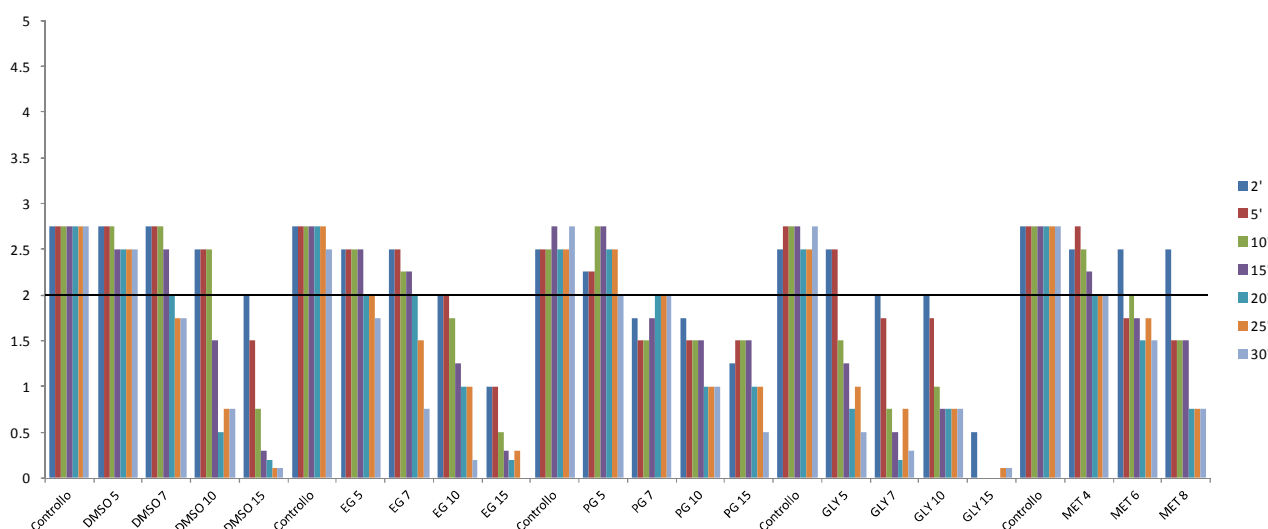


Figura 34. Adattamento del seme di *Crassostrea brasiliana* esposto in differenti concentrazioni di CPA (DMSO, EG, PG, GLY, MET) a temperatura ambiente (22°C).

Dopo 30 minuti di incubazione, ad eccezione del DMSO 5%, tutti i crioprotettivi si sono dimostrati estremamente tossici per gli spermatozoi di *C. brasiliana*, inducendo riduzioni della motilità spermatica rispetto al controllo già alla più bassa concentrazione testata (5%).

In generale è stata evidenziata una tendenza all'aumento della tossicità all'aumentare della concentrazione e del tempo di incubazione.

Il DMSO ha dimostrato una bassa tossicità fino a 10 minuti di incubazione nelle concentrazioni uguali e inferiori a 10%. La concentrazione 15% è risultata essere molto tossica per gli spermatozoi. Tuttavia il seme incubato nel DMSO 5% ha presentato la migliore performance del test mostrando al 30° minuto una motilità classe 2,5.

Anche l'EG ha esibito una buona performance nel test mantenendo una buona motilità fino a 15 minuti alle concentrazioni 5% e 7%. Le concentrazioni 10% e 15% hanno esibito rispettivamente tossicità moderata e elevata.

Per quanto riguarda il PG e il GLY entrambi i crioprotettivi hanno presentato una performance paragonabile dove la motilità è stata mantenuta solo nei primi cinque minuti alla concentrazione 5%. Al 7% gli spermatozoi esibiscono già una rilevante perdita di motilità così come alle altre concentrazioni più elevate.

Sorprendentemente il MET ha avuto una bassa tossicità nei primi 2 minuti in tutte le concentrazioni testate. Tuttavia l'effetto tossico è stato evidenziato subito dopo 5 minuti dall'incubazione nelle concentrazioni 6% e 8%. La concentrazione 4% ha esibito una bassa tossicità con motilità spermatica superiore a classe 2,0 per 30 minuti. Sansone et al. (2005) e Nascimento et al. (2005)

osservarono un elevato effetto tossico del metanolo negli spermatozoi dell'ostrica *Crassostrea rhizophorae* mentre Zeni et al. (2009a) ottennero classe 2,5 di motilità spermatica per *Crassostrea sp.* dopo 20 minuti di incubazione al MET 15%.

La Tabella XV presenta una sintesi del risultato osservato in questo esperimento attribuendo una classificazione di tossicità conforme alla riduzione della motilità nel tempo. In questo caso la permanenza per oltre 5 minuti nella classe 2,0 è stata utilizzata come riferimento per la classificazione “bassa tossicità”. Le concentrazioni di CPA che hanno raggiunto valori superiori o uguali alla classe 2,0 soltanto nei primi due minuti sono state considerate come “moderata tossicità”.

Tabella XV. Sintesi del risultato osservato nell'esperimento di selezione dei CPA (DMSO, EG, PG, GLY, MET) realizzato con seme di *Crassostrea brasiliana*. Le crocette indicano il livello di tossicità: (+) moderata tossicità (++) bassa tossicità.

| | DMSO | | | | EG | | | | PG | | | | GLY | | | | MET | | |
|--------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|-----|---|----|----|-----|---|---|
| Concentrazione (%) | 5 | 7 | 10 | 15 | 5 | 7 | 10 | 15 | 5 | 7 | 10 | 15 | 5 | 7 | 10 | 15 | 4 | 6 | 8 |
| Selezionati | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | + | | ++ | + | | | ++ | + | + | | ++ | + | + |

Prove di congelamento

La Figura 35 riproduce le cinque curve di congelamento testate nelle prove di criopreservazione del seme di *Crassostrea brasiliana*.

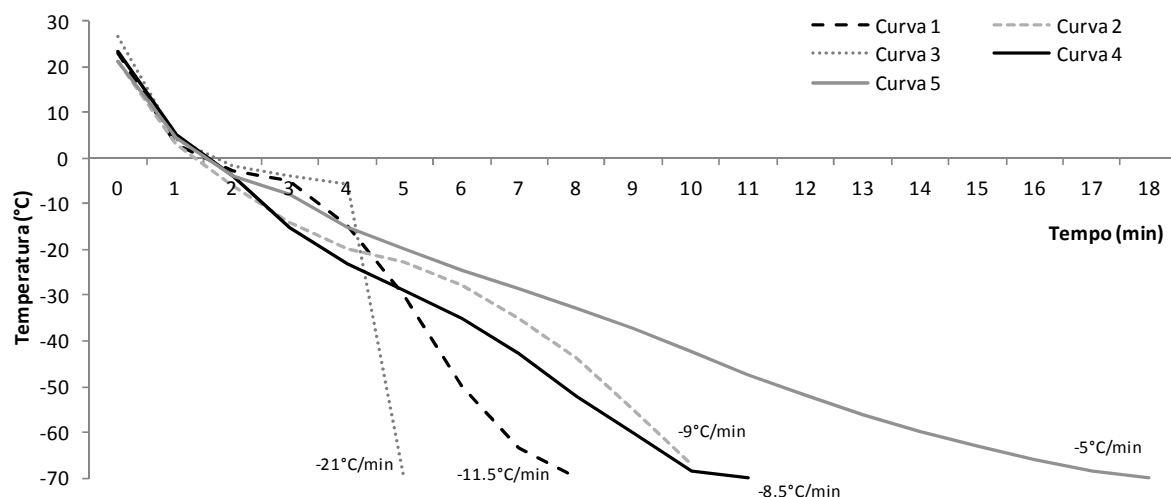


Figura 35. Curve di congelamento impiegate per le prove di criopreservazione del seme di *Crassostrea brasiliana*.

Tra le curve testate si evidenziano tre tipologie di congelamento: il congelamento rapido, rappresentato nella curva n°3 con un gradiente di -21°C/min; il congelamento moderato,

rappresentato nelle curve n°1, 2 e 4 dove il gradiente di congelamento varia da -8,5 a -11,5°C/min; il congelamento lento, riprodotto nella curva n°5 con gradiente di congelamento di -5°C/min.

Per quanto riguarda il gradiente di congelamento sono divergenti le informazioni disponibili nella letteratura. Per la criopreservazione di seme dell'ostrica *Crassostrea gigas* Yankson & Moyse (1991) ed Ieropoli et al. (2004) utilizzarono un gradiente lento di circa -5°C/min diversamente dai protocolli descritti da Adams et al. (2004) e Smith et al. (2001) che usarono un gradiente di congelamento rapido -50°C/min per la stessa specie. Per l'ostrica piatta *Ostrea edulis* e l'ostrica americana *Crassostrea virginica* il gradiente di congelamento lento si è dimostrato essere più efficiente (Vitiello et al., 2011; Paniagua-Chavez & Tiersch, 2001).

Dopo il congelamento e il successivo scongelamento dei semi incubati con le differenti concentrazioni di CPA i migliori risultati sono stati ottenuti dalle curve con gradiente di congelamento moderato (congelamento 1, 2 e 4). I gradienti di congelamento lento e rapido (congelamento 5 e 3) risultarono soltanto nella vibrazione di scarsi spermatozoi (Tabella XVI).

Tabella XVI. Risultato degli esperimenti di congelamento di seme di *Crassostrea brasiliana* dopo adattamento di 10 minuti a 22°C ai differenti CPA a seguito di congelamento con vapori di azoto liquido in cinque gradienti distinti, -5 °C/min, -8,5 °C/min, -9 °C/min, -11,5 °C/min e -21°C/min. I risultati sono espressi in classe di motilità e le crocette indicano l'intensità della vibrazione degli spermatozoi dopo scongelamento: (+) bassa intensità, (++) alta intensità, (+++) alta intensità con scarsi spermatozoi mobili, (na) non valutabile.

| CPA (%) | DMSO 5 | DMSO 7 | DMSO 10 | EG 5 | EG 7 | EG 10 | PG 5 | PG 7 | GLY 5 | GLY 7 | MET 4 | MET 6 | MET 8 |
|---------------------------------------|--------|--------|---------|------|------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Congelamento 1 -11,5 °C/min | + | + | + | + | +++ | + | | | | | | | |
| Congelamento 2 -9 °C/min | + | + | + | + | ++ | ++ | + | + | + | | + | + | + |
| Congelamento 3 -21 °C/min | + | + | + | + | + | + | | + | | na | + | na | na |
| Congelamento 4 -8,5 °C/min | + | ++ | + | + | ++ | ++ | | | + | na | | na | na |
| Congelamento 5 -5 °C/min | + | + | + | + | + | + | | + | | na | | na | na |

Tutti i gradienti di congelamento utilizzati non preservano un'effettiva motilità spermatica. Solamente sono state osservate vibrazioni degli spermatozoi ed eccezionalmente la motilità di scarsi spermatozoi mediante l'utilizzo dello EG 7%. I migliori risultati sono stati ottenuti mediante utilizzo degli EG 7%, EG 10% e DMSO 7% rivelando numerosi spermatozoi dotati di vibrazioni intense. Altrimenti i CPA propilen glicole, glicerolo e metanolo non dimostrarono una protezione efficace contro i danneggiamenti cellulari derivanti dal processo di congelamento.

Non esistono informazioni riguardo alla criobiologia di *Crassostrea brasiliana*, si fa presente che questa è la prima iniziativa volta al congelamento del seme di questa specie. Altre prove devono essere fatte con differenti combinazioni di CPA e gradiente di congelamento per l'ottimizzazione del processo. Il risultato qui presentato dimostra un concreto punto di partenza per l'elaborazione di un protocollo di migliore criopreservazione.

Selezione degli agenti crioprotettivi

Sono riportati in Figura 36 i valori di motilità spermatica registrati a seguito dell'incubazione del seme a temperatura ambiente (22°C) in presenza dei CPA dimetilsolfossido, etilen glicole, propilen glicole, glicerolo e metanolo.

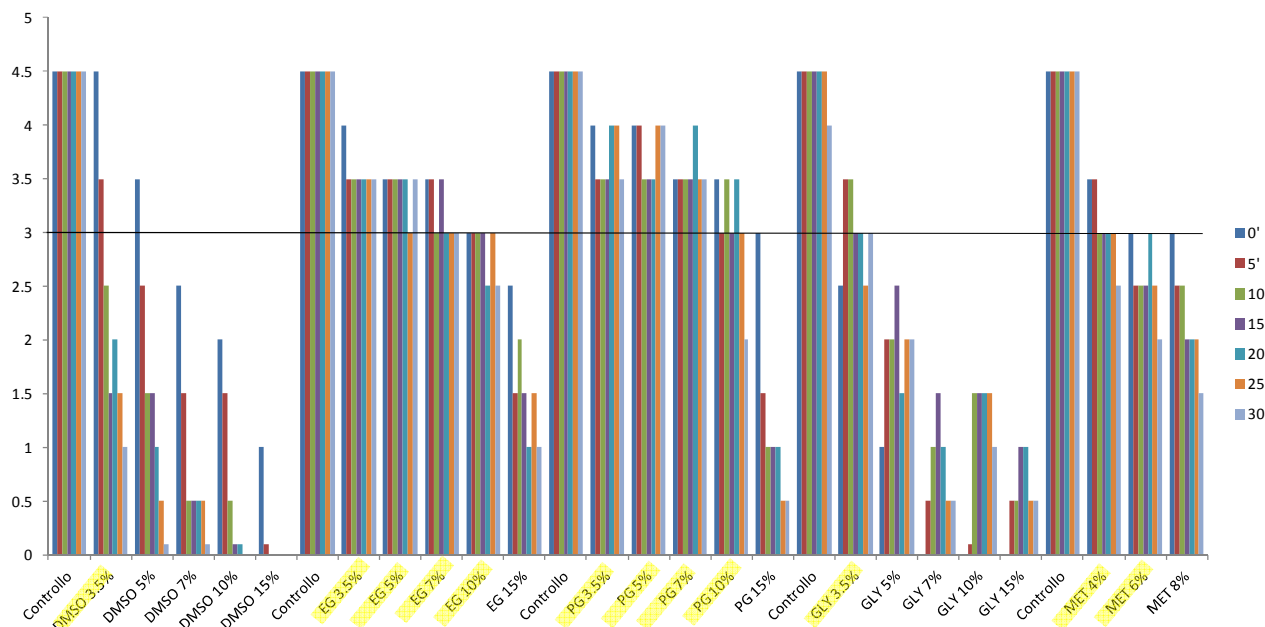


Figura 36. Adattamento del seme di *Nodipecten nodosus* esposto in differenti concentrazioni di CPA (DMSO, EG, PG, GLY, MET) a temperatura ambiente (22°C).

In generale tutti i crioprotettivi hanno dimostrato di essere tossici per gli spermatozoi dopo il periodo di incubazione, inducendo riduzioni della motilità spermatica rispetto al controllo. La motilità spermatica è stata significativamente ridotta ($p \leq 0,05$) dopo 10 minuti dall'attivazione rispetto al controllo. Il glicerolo (GLY) e il dimetilsolfossido (DMSO) sono stati considerati i CPA più tossici per gli spermatozoi.

La permanenza per più di 5 minuti in classe di motilità superiore alla classe 3,0 è stata utilizzata come riferimento per la selezione dei CPA meno tossici. L'etilen glicole (EG) e il propilen glicole (PG) fino a 10% sono stati considerati i CPA meno tossici per *N. nodosus*. Tuttavia anche i CPA DMSO 3,5%, GLY 3,5% e MET 4% e 6% sono state utilizzati per la fase di congelamento.

Nell'esperimento preliminare di criopreservazione del seme di *N. nodosus* con 3 minuti di adattamento a temperatura ambiente, Reis et al. (2003) hanno individuato il DMSO e il PG nelle concentrazioni 3% e 5% come i CPA più efficaci, però senza valutare la motilità spermatica precongelamento. Allo stesso modo il DMSO è stato indicato per la criopreservazione del seme di *Chlamys farreri* (Xue & Xiang, 1995; Li et al., 2000) e *Argopecten purpuratus* (Dupré & Espinoza, 2004).

Prove di adattamento/raffreddamento

Sulla base dei risultati ottenuti nella fase precedente il periodo di 10 minuti di adattamento è stato scelto per le prove di precongelamento. La motilità spermatica di *N. nodosus* dopo 10 minuti di

adattamento agli agenti crioprotettivi e a differenti regimi termici (7°C e 18°C) è rappresentata nella Figura 37.

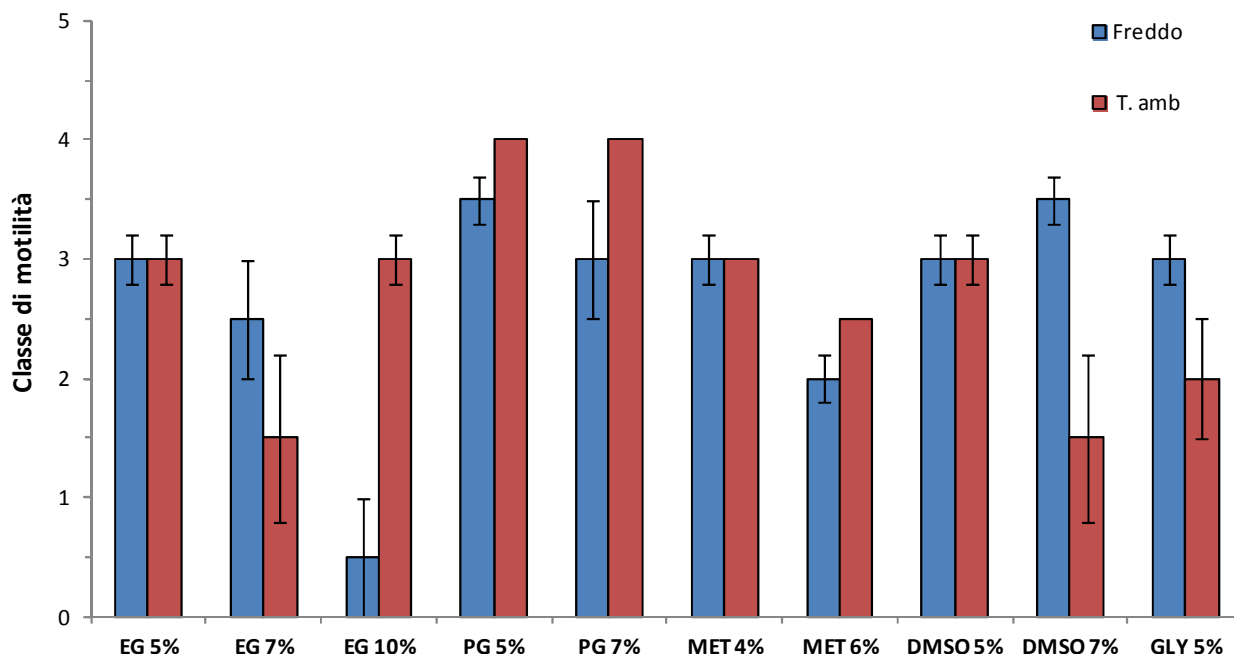


Figura 37. Prove di tossicità con seme di *Nodipecten nodosus* esposto per 10 minuti sotto differenti regimi termici: al freddo (7°C) ed a temperatura ambiente (22°C).

Alle basse concentrazioni per tutti i CPA non sono state riscontrate differenze significative tra i regimi termici, eccetto per GLY 5%. Tuttavia il seme esposto al freddo ha dimostrato migliore performance con DMSO 7% e GLY 5%. Diversamente i crioprotettivi EG 10%, PG 5% e 7% e MET 6% hanno avuto motilità superiore quando adattati a temperatura ambiente.

In base a questi risultati si è proceduto con l'adattamento a temperatura ambiente quale fase di precongelamento.

Prove di congelamento

La Figura 38 riproduce le curve di congelamento testate nelle prove di criopreservazione del seme di *Nodipecten nodosus*.

Tra le curve testate si evidenziano tre tipologie di congelamento: il congelamento rapido, rappresentato nella curva n°5 con un gradiente di -24°C/min; il congelamento moderato, rappresentato nelle curve n°3 e n°4 dove il gradiente di congelamento varia da -9,9 a -11,2°C/min; il congelamento lento, riprodotto nelle curve n°1 e n°2 con gradiente di congelamento inferiore a -8°C/min.

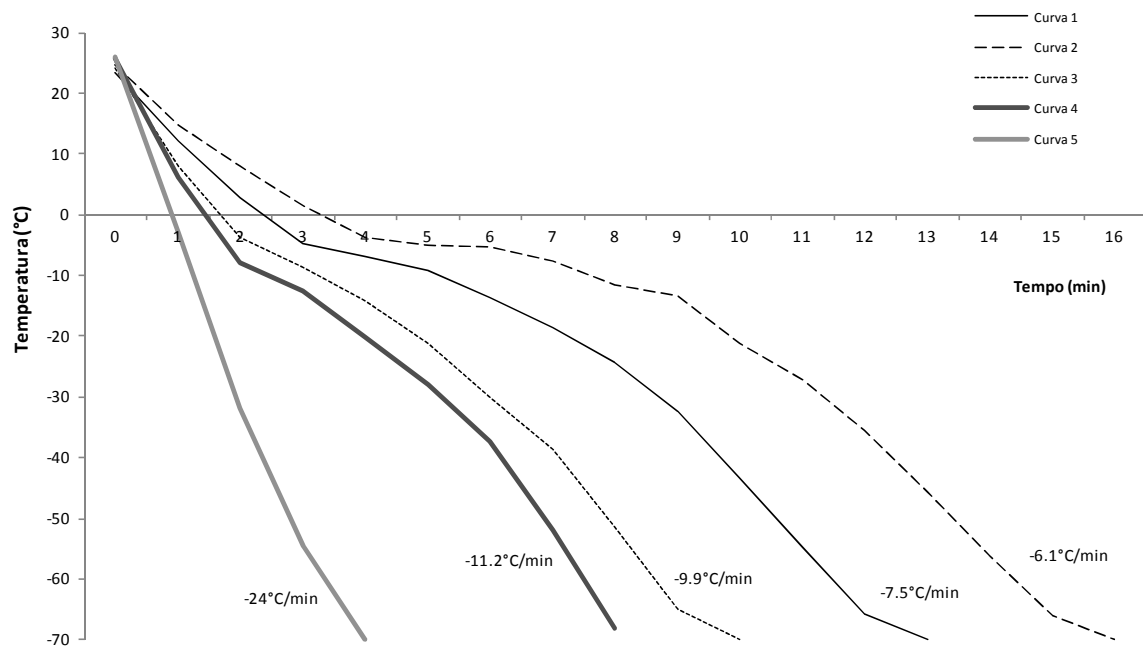


Figura 38. Curve di congelamento impiegate per le prove di criopreservazione del seme di *Nodipecten nodosus*.

Dopo scongelamento del seme incubato con le differenti concentrazioni di CPA i migliori risultati sono stati ottenuti dalle curve con gradiente di congelamento lento (curve 1 e 2) e moderato (curva 3) (Figura 39).

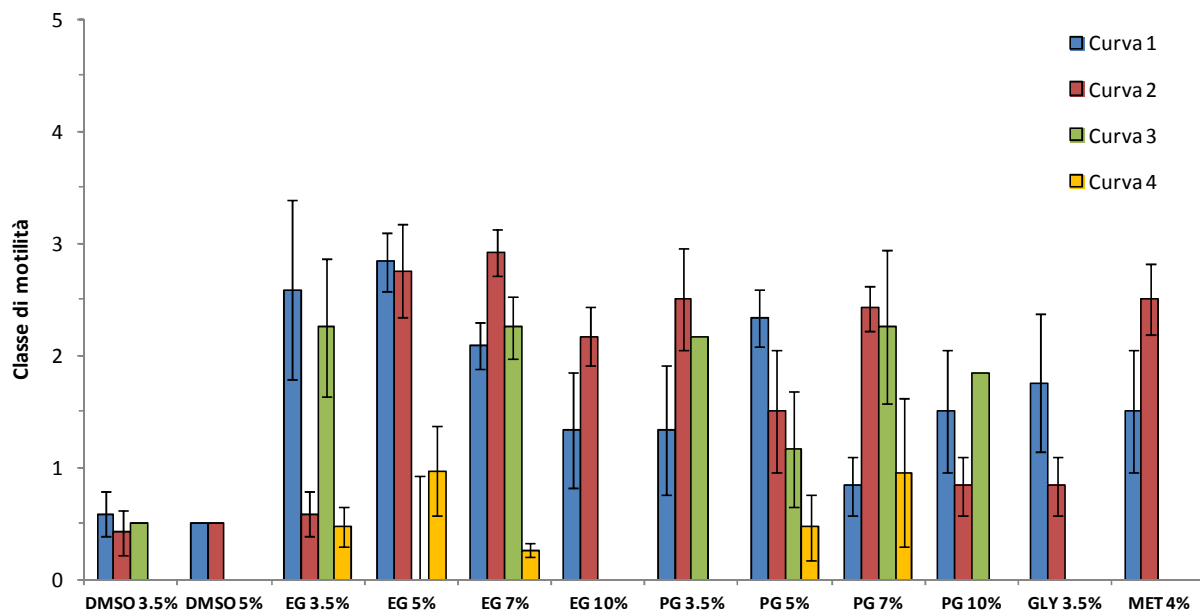


Figura 39. Criopreservazione del seme di *Nodipecten nodosus* dopo adattamento di 10 minuti a temperatura ambiente (22°C) ai differenti CPA. Il congelamento è stato fatto con vapori di azoto liquido in cinque gradienti distinti: -7,5°C/min (curva 1), -6,1°C/min (curva 2), -9,9°C/min (curva 3), -11,2°C/min (curva 4) e -24°C/min (curva 5). Il seme utilizzato nella curva 5 non ha prodotto spermatozoi motili.

I migliori risultati sono stati ottenuti mediante utilizzo di EG nelle concentrazioni 7% e 5% scongelando spermatozoi RVL di classe 3,0, mentre il DMSO non ha dimostrato una protezione efficace contro i danneggiamenti cellulari.

Risultato paragonabile è stato osservato per il pectenideo *Argopecten purpuratus* in cui il gradiente ottimale di congelamento è stato $-8,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ però mediante utilizzo di DMSO aggiunto con altri protettori extracellulari (Duprè & Spinoza, 2004). Tuttavia per *A. purpuratus* sono state evidenziate diverse alterazioni morfologiche negli spermatozoi dopo scongelamento quali la deformazione e gonfiamento della testa, la rottura della membrana cellulare, l'estrusione dell'acrossoma, il danneggiamento mitocondriale, la rottura e l'irrigidimento del flagello (Espinoza et al., 2010).

Per quanto riguarda *N. nodosus* Zeni et al. (2009b) ottennero 40% di spermatozoi motili dopo scongelamento utilizzando il DMSO 10% come crioprotettivo dopo 20 minuti di adattamento, tuttavia non vi sono informazioni disponibili sul gradiente di congelamento e sulla temperatura della fase di adattamento.

Li et al. (2000) ottennero circa il 50% di spermatozoi motili nel congelamento del seme del pectenideo *Chlamys (Azumapecten) farreri* mediante utilizzo di DMSO 5% con adattamento a freddo per 2 minuti e gradiente di congelamento $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Effetto dell'aggiunta di glicina nella criopreservazione

La Figura 40 presenta la motilità spermatica di *Nodipecten nodosus* dopo congelamento e scongelamento del seme mediante la presenza di crioprotettivi con e senza la glicina 0,6%.

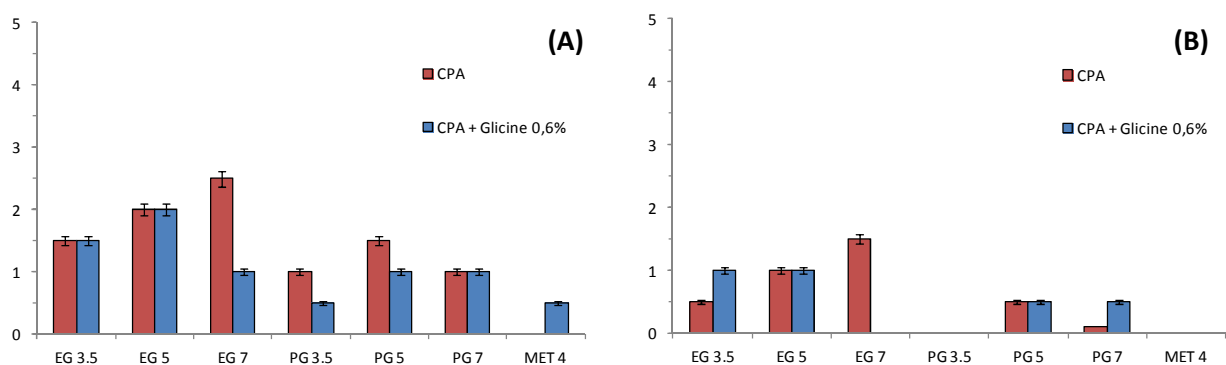


Figura 40. Motilità spermatica del seme criopreservato di *Nodipecten nodosus* immediatamente dopo lo scongelamento (A) e dopo 2 ore (B). Il congelamento è stato fatto dopo adattamento di 10 minuti (22°C) ai differenti CPA con e senza glicina 0,6% in gradiente di $-6,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Il risultato ha dimostrato che la glicina non ha incrementato la motilità spermatica di *N. nodosus* dopo scongelamento. Soltanto nel campione con metanolo 4% la glicina ha esibito una motilità superiore. Dopo due ore dallo scongelamento non è comunque stato chiaro l'effetto della glicina sulla motilità spermatica di *N. nodosus*. Infatti nei campioni EG 3,5% e PG 7% l'aggiunta di glicina sembra avere sostenuto una migliore motilità, tuttavia questo andamento non è stato verificato per gli altri campioni testati.

Alcune ricerche riferiscono di un effetto positivo della glicina sulla motilità spermatica di teleostei dopo scongelamento, particolarmente a carico del compartimento mitocondriale e della riserva di ATP (Lahnsteiner et al., 2000; He & Woods III, 2003; He & Woods III, 2004). Tuttavia Xue & Xiang (1995) osservarono un effetto dannoso dell'aggiunta di glicina per la vitalità spermatica del mollusco *Chlamys farreri*.

3.9 Conclusioni

- ✓ Gli spermatozoi di *Paracentrotus lividus*, *Perna perna* e *Crassostrea brasiliana* hanno dimostrato di essere sistemi biologici estremamente fragili. Ulteriori prove di congelamento devono essere fatte per l'ottimizzazione di questi protocolli.
- ✓ Il congelamento rapido nel gradiente di $-61^{\circ}\text{C}/\text{min}$, utilizzando paillettes da 250 μl , mediante utilizzo di DMSO 7% per 10 minuti di adattamento a freddo ha dimostrato di essere il procedimento che ha dato i migliori risultati (1,5/2,0) per la criopreservazione del seme di *P. lividus*.
- ✓ Le prove di criopreservazione hanno indicato una rilevante criopreservabilità del seme della specie *Nodipecten nodosus*. I migliori risultati sono stati ottenuti attraverso il gradiente di congelamento di -6 e $-7,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mediante utilizzo di EG nelle concentrazioni 7% e 5% per 10 minuti di adattamento a temperatura ambiente.

3.10 Bibliografía

- Adams SL, Smith JF, Roberts RD, Janke AR, Kaspar HF, Tervit HR, Pugh PA, Webb SC, King NG (2004) Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production. *Aquaculture* 242:271-282.
- Asahina E, Takahashi T (1977) Survival of sea urchin spermatozoa and embryos at very low temperatures. *Cryobiology* 14:703.
- Asahina E, Takahashi T (1978) Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin. *Cryobiology* 15:122-127.
- Asahina E, Takahashi T (1979) Cryopreservation of sea urchins embryos and sperm. *Dev Growth Differ* 21:423-430.
- Barros C, Muller A, Wood MJ, Whittingham DG (1996) High survival of sea urchin semen (*Tetrapigus niger*) pluteus larvae (*Loxechinus albus*) frozen in 1.0 M Me₂SO. *Cryobiology* 33:646.
- Barros C, Muller A, Wood MJ (1997) High survival of spermatozoa and pluteus larvae of sea urchins frozen in Me₂SO. *Cryobiology* 35:341.
- Bellas J, Paredes S (2011) Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: Potential application in marine water quality assessment. *Cryobiology* 62:174-180.
- Di Matteo O, Langellotti AL, Masullo P, Sansone G (2009) Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology* 58:145-150.
- Dupré E, Espinoza C (2004) Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Invest Mar Valparaíso* 32:3-9.
- Espinoza C, Valdivia M, Dupré E (2010) Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. *Lat Am J Aquat Res* 38:121-128.
- Fabbrocini A, Lubrano Lavadera S, Rispoli S, Sansone G (2000) Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40:46-53.
- He S, Woods III LC (2003) Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology* 46:17-25.

- He S, Woods III LC (2004) Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 48:254-262.
- Ieropoli S, Masullo P, Espirito Santo M, Sansone G (2004) Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49:250-257.
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T (2000) Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54:1477-1498.
- Li C, Li J, Xue QZ (2000) Cryopreservation of the spermatozoa of *Chlamys (Azumapecten) farreri*, *Progress in Fishery Sciences* 2:57-62.
- Lombardi, E. Criobiologia di Spermatozoi di *Paracentrotus lividus*. Tesi di Laurea Sperimentale in Fisiologia dello Stress in Ambiente Acquatico. Università degli Studi di Napoli "Federico II", Facoltà di Scienze MM. FF. NN, 2006
- Nascimento IA, Leite MB, Araújo MMS, Sansone G, Pereira SA, Espírito Santo M (2005) Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos. *Cryobiology* 51:113-117.
- Paniagua-Chavez CG, Tiersch TR (2001) Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology* 43:211-223.
- Paredes S, Bellas J (2009) Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. *Cryobiology* 59:344-350.
- Reis ACP, Pauls E, Cabezas CMV, Castro MAL. Preliminary studies in cryopreservation of spermatozoa of *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758), a native scallop from Brazil. *Book of Abstracts: World Aquaculture 2003*, Salvador, Brazil, 2003, p. 584.
- Sansone G, Nascimento IA, Leite MB, Araújo MMS, Pereira SA, Mariani AM (2005) Toxic effects of cryoprotectants on oyster gametes and embryos: a preliminary step towards establishing cryopreservation protocols. *Biociências Porto Alegre* 13:11-18.
- Smith JF, Pugh PA, Tervit HR, Roberts RD, Janke AR, Kaspar HF, Adams SL (2001) Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos. *Proc N Z Soc Anim Prod* 61:31-34.
- Smith JF, Adams SL, Gale SL, McGowan LT, Tervit HR, Roberts RD (2012) Cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) sperm. I. Establishment of freezing protocol. *Aquaculture* 337:199-204.

- Vitiello V, Carlino PA, Del Prete F, Langellotti AL, Sansone G (2011) Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 63:118-124.
- Vitiello, V. Applicazioni criobiologiche in acquacoltura e nella gestione delle risorse idrobiologiche. Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2011
- Yankson K, Moyse J (1991) Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters. *Aquaculture* 97:259-267.
- Xue QZ, Xiang JH (1995) Effects of different combinations of cryoprotectants on spermatozoon vitality of chinese scallop, *Chlamys farreri*, during low temperature equilibrium. *Chinese J Oceanol Limnol* 13:354-361.
- Zeni TO, Moraes D, Sotelo DP, Serafim-Junior M, Pauls E. Avaliação do efeito tóxico de diferentes crioprotetores sobre espermatozóides de ostras do gênero *Crassostrea*. *Anais do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia*, Rio de Janeiro, Brasil, 2009a.
- Zeni TO, Sotelo DP, Pauls E, Serafim-Junior M. Efeito tóxico de dimetil sulfoxido na criopreservação de gametas e embriões de *Nodipecten nodosus* (Mollusca, Pectinidae). *Anais do XXI Encontro Brasileiro de Malacologia*. Rio de Janeiro: Brasil 2009b.

3.11 Ottimizzazione e progettazione di biosaggi con spermatozoi criopreservati

3.12 Materiali e Metodi

In questa fase sperimentale sono state previste l'ottimizzazione del biosaggio (*CRYO-ecotest*) con seme criopreservato di Orata (*Sparus aurata*) proposto da Vitiello (2011) e la progettazione di un nuovo test mediante utilizzazione di seme criopreservato di molluschi marini.

Per l'ottimizzazione del *CRYO-ecotest* è stata proposta l'utilizzazione di differenti matrici ambientali rappresentando una variabilità di ecosistemi acquatici, inclusi nell'intervallo di salinità 7-12‰. Questi valori corrispondono alla stessa pressione osmotica in cui gli spermatozoi si trovano immobili nelle gonadi di Orata (300 ± 50 mOsm). In questo modo è possibile incubare gli spermatozoi immobili (Sansone et al., 2001) per un determinato periodo in differenti soluzioni di xenobiotici/matrici ambientali per dopo attivarli e valutare la motilità per controllare eventuali effetti.

Diversamente dalla metodologia presentata, la progettazione di un nuovo biosaggio con spermatozoi criopreservati di molluschi marini prevede l'attivazione del seme direttamente in una sospensione contenente lo xenobiotico da testare utilizzando come end-point i parametri fisiologici della motilità spermatica.

La valutazione qualitativa degli spermatozoi è stata effettuata analizzando la motilità spermatica, espressa in classi (da 0 a 5), in base alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL), secondo la correlazione proposta da Fabbrocini et al. (2000).

Ogni esperimento, effettuato in triplicato, è stato ripetuto almeno tre volte ($n \geq 9$). L'analisi statistica è stata condotta effettuando il Test t di Student per analizzare le differenze significative tra il controllo e xenobiotici. Il valore $p < 0,05$ è stato scelto come livello per la significatività.

➤ Ottimizzazione del biosaggio con seme criopreservato di orata

Criopreservazione del seme

Tutte le sperimentazioni sono state condotte su spermatozoi ottenuti da esemplari maschi sessualmente maturi di *Sparus aurata* allevati presso l'azienda Panittica Pugliese di Torrecanne (BR).

Il seme è stato prelevato per stripping addominale e tenuto a secco in tubi plastici da 50ml. Il trasporto del seme al laboratorio è stato effettuato entro 6 ore dal prelievo, mantenendo il materiale biologico a secco, in ambiente isolato, ad una temperatura di $3 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 41).



Figura 41. Prelievo del seme di Orate (*Sparus aurata*) allevate presso l'azienda Panittica Pugliese di Torrecanne (BR).

Per tutte le fasi della sperimentazione sono stati utilizzati pools costituiti da spermatozoi con classe di motilità maggiore di classe 3,0. Campioni di spermatozoi caratterizzati da una minore motilità spermatica sono stati scartati.

Gli spermatozoi di *Sparus aurata* sono stati criopreservati utilizzando il protocollo messo a punto da Fabbrocini et al. (2000). La qualità del materiale biologico è stata controllata miscelando il liquido seminale criopreservato con acqua di mare filtrata e sterilizzata (0,22 μ m, 36‰, pH 8,02, 18°C).

Dopo il congelamento le paillettes sono state trasferite e conservate in un contenitore criogenico e mantenute a -196°C. Uno stock omogeneo di seme è stato conservato per un periodo di 6 mesi per la realizzazione dei test, totalizzando da 30,5 ml di seme prelevato fresco, 152 paillettes da 250 μ l criopreservato.

Il saggio ecotossicologico – CRYO-ecotest

✓ *Matrici ambientali*

Il seme criopreservato di *S. aurata* è stato scongelato ed immediatamente incubato in due matrici ambientali: sedimento dragato del Porto di Viareggio (TO) e percolato proveniente da una discarica di Caserta (NA) (Figura 42).



Figura 42. Illustrazione del CRYO-ecotest: scongelamento delle paillettes ed incubazione del seme.

L'elutriato del sedimento è stato preparato d'accordo con i procedimenti descritti nella ASTM (1997) e diluito nei rapporti 1:1, 1:10, 1:100 in NaCl 1%. Il percolato è stato preparato mediante diluizione 1:1, 1:10, 1:100; 1:1000 in NaCl 1%. L'incubazione del seme è stata fatta mediante diluizione 1:6 nelle matrici testate per 60 minuti a 3°C. Un'aliquota di seme incubato in NaCl 1% nelle stesse condizioni è stata utilizzata come controllo.

Al termine del periodo di incubazione il seme è stato attivato in acqua di mare filtrata e sterilizzata (26,6°C; 36‰; pH 8,23) nel rapporto 1:100 (V/V). L'andamento della motilità nel tempo è stato analizzato al microscopio ottico (x200) e valutato in classi di motilità (Fabbrocini et al., 2000). Sono stati analizzati i parametri fisiologici della motilità spermatica: tempo di attivazione, massima classe di motilità raggiunta, durata della massima motilità e durata totale della motilità spermatica.

➤ Progettazione di biosaggi con seme di molluschi marini

Le prove di tossicità condotte per selezionare i crioprotettivi meno tossici nel congelamento degli spermatozoi di questi molluschi sono state la base preliminare per individuare la possibilità di utilizzo di questi sistemi biologici, utilizzabili con la determinazione dei parametri della motilità, per nuovi test ecotossicologici, utili per la valutazione della qualità delle acque degli ambienti marino costieri. Infatti, in tali prove, gli spermatozoi hanno mostrato una buona sensibilità agli xenobiotici con ottima correlazione dose/effetto.

Basandosi sulla conoscenza della motilità spermatica di *Paracentrotus lividus*, organismo modello per test di spermiotossicità, sono stati scelti d'accordo con la fase sperimentale precedente i molluschi che hanno presentato motilità spermatica paragonabile a questa specie.

I parametri della motilità spermatica dei molluschi marini previamente determinati nel capitolo 3.1 sono stati confrontati con quelli osservati per il riccio *Paracentrotus lividus*.

3.13 Risultati e discussioni

➤ Ottimizzazione del biosaggio con seme criopreservato di orata

I valori di motilità spermatica di *S. aurata* registrati dopo 60 minuti dall'incubazione del seme criopreservato e scongelato in presenza di elutriato a differenti diluizioni sono riportati in Figura 43.

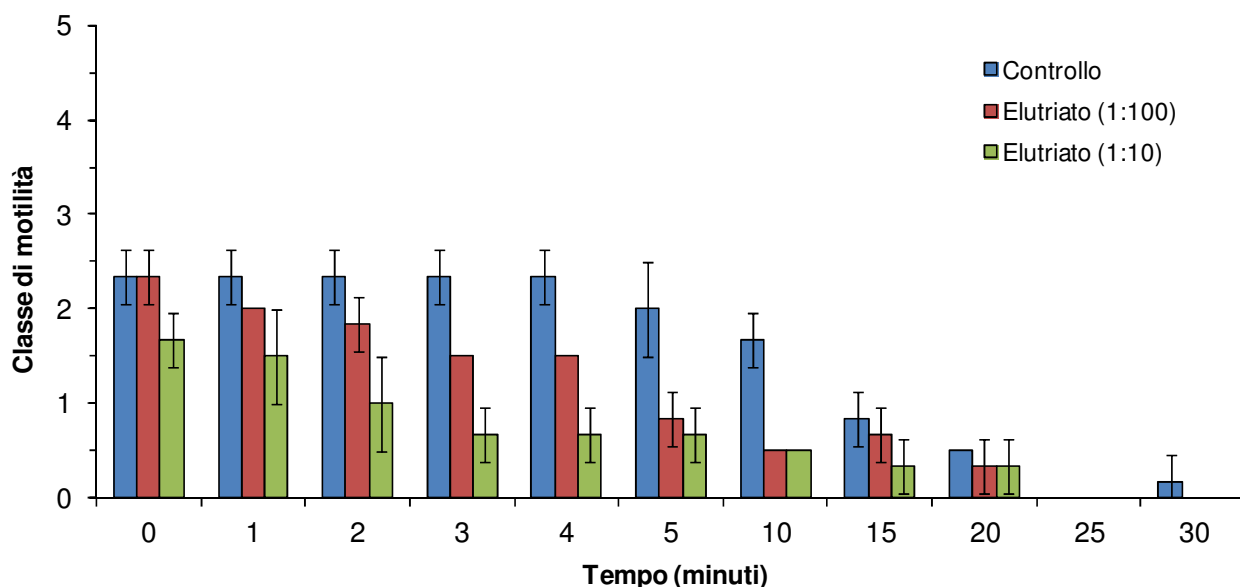


Figura 43. Motilità del seme criopreservato di *S. aurata* dopo 60 minuti di incubazione a 3°C nell'elutriato/NaCl 1%.

La massima classe di motilità del controllo (NaCl 1%) ha raggiunto valore superiore alla classe 2,0 ed è stata mantenuta per 5 minuti. L'effetto tossico dell'elutriato è stato osservato immediatamente all'attivazione del seme già per la diluizioni 1:10 ($p < 0,05$).

Nella Tabella XVII è riportata la risposta del test sui parametri fisiologici della motilità del seme criopreservato di *Sparus aurata*. I parametri, tempo di attivazione, massima classe di motilità e durata della massima classe di motilità, hanno esibito differenze significative tra il controllo e l'elutriato.

Tabella XVII. Risposta del test con elutriato sui parametri fisiologici della motilità del seme criopreservato di *S. aurata*. (+) differenza rispetto al controllo (-) indifferente.

| Parametri di motilità | Controllo (NaCl 1%) | Elutriato (1:100) | Elutriato (1:10) |
|---|---------------------|-------------------|------------------|
| Tempo di attivazione | Attivi al T0 | - | + |
| Massima classe di motilità | 2,5 | - | + |
| Durata della massima classe di motilità | 4' | + | + |
| Durata totale della motilità | 20' | - | - |

Basandosi su questi risultati è stata progettata una tabella per l'interpretazione dei dati. Questa tabella presenta una scala di tossicità composta per differenti categorie: poco tossico, mediamente tossico, tossico e altamente tossico (Tabella XVIII). Ogni parametro della motilità riproduce un punteggio nella scala, ed ogni risposta significativamente differente dal controllo rappresenta la validazione di questo punteggio simbolizzata con una crocetta (+). In questo modo si conclude che l'elutriato è stato classificato come poco tossico (+) nella diluizione 1:100 e tossico (+++) nella diluizione 1:10.

Tabella XVIII. Interpretazione dei dati secondo la scala di tossicità.

| Scala di tossicità | | | | |
|---------------------------|---|---|---|---|
| Tossicità elevata | + | + | + | + |
| Tossico | + | + | + | - |
| Mediamente tossico | + | + | - | - |
| Poco tossico | + | - | - | - |

L'andamento della motilità spermatica del seme criopreservato di *S. aurata* dopo 60 minuti a 3°C dall'incubazione al percolato è riportato nella figura 44.

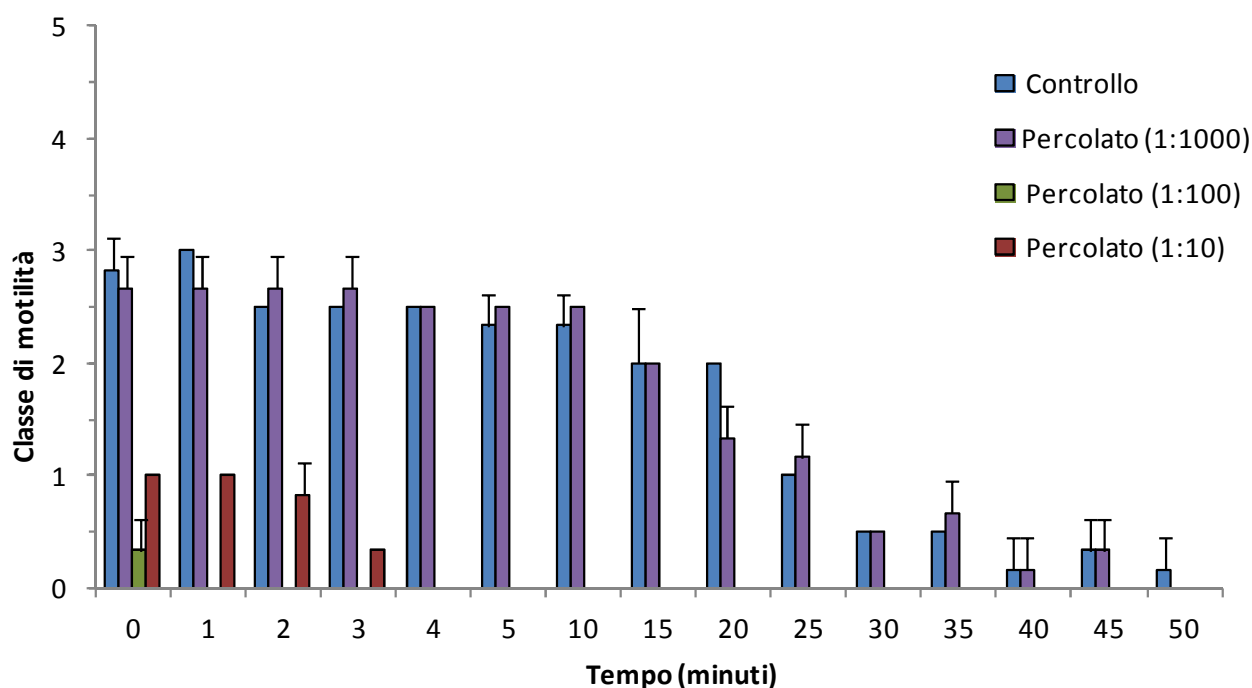


Figura 44. Motilità del seme criopreservato di *S. aurata* dopo 60 minuti di incubazione a 3°C nel percolato/NaCl 1%.

In questo saggio è stato osservato chiaramente l'effetto tossico del percolato sulla motilità spermatica dopo 60 minuti dall'incubazione. La severità del percolato nelle diluizioni massime

(1:10, 1:100) è risultata nell'immobilità degli spermatozoi già all'inizio delle osservazioni fino a 3 minuti. Tuttavia la diluizione 1:1000 ha avuto una performance paragonabile al controllo.

Nella Tabella XIX è riportata la risposta del test sui parametri fisiologici della motilità del seme criopreservato di *Sparus aurata*. I parametri, tempo di attivazione, massima classe di motilità e durata della massima classe di motilità, hanno esibito differenze significative tra il controllo e il percolato.

Tabella XIX. Risposta del test con percolato sui parametri fisiologici della motilità del seme criopreservato di *S. aurata*. (+) differenza rispetto al controllo (-) indifferente.

| Parametri di motilità | Percolato (1:1000) | Percolato (1:100) | Percolato (1:10) |
|--|--------------------|-------------------|------------------|
| Tempo di attivazione | - | + | + |
| Massima classe di motilità | - | + | + |
| Durata della massima classe di motilità | - | + | + |
| Durata totale della motilità | + | + | + |

Il test ha individuato chiaramente l'effetto altamente tossico del percolato nelle diluizioni 1:10 e 1:100. La diluizione 1:1000 è risultata essere poco tossica con differenza soltanto nel parametro durata totale della motilità spermatica.

La sensibilità del *CRYO-ecotest* è stata confrontata mediante analisi computerizzata per mezzo del sistema *SCA Sperm Class Analyzer*® (Fabbrocini et al., 2012a; Silvestri et al., 2011) dimostrando la semplicità e la potenzialità del test utilizzando seme criopreservato di teleostei particolarmente di *S. aurata* valutandone i parametri in "visual" della motilità. I risultati ottenuti utilizzando il test proposto rappresentano un punto di partenza molto promettente per ulteriori studi diretti all'utilizzo della crioconservazione quale biotecnologia di sostegno alle indagini ecotossicologiche in ambienti acquatici.

➤ Progettazione di biosaggi con seme di molluschi marini

Basandosi sulla conoscenza della motilità spermatica di *Paracentrotus lividus*, organismo modello per test di spermiossicità, sono stati selezionati d'accordo con la fase sperimentale precedente i molluschi che presentano motilità spermatica paragonabile a questa specie. In questo modo sono stati utilizzati come valore di riferimento i parametri fisiologici della motilità spermatica di *P. lividus* presentati nel capitolo 3.1.

Tradizionalmente i gameti di ricci sono utilizzati per saggi ecotossicologici, in particolare per test di spermiossicità (Stober et al., 1979; Pagano et al., 1982; Dinnel et al., 1981; Nacci et al., 1986; Dinnel et al., 1987; Arizzi Novelli et al., 2002; Arizzi Novelli et al., 2003; Losso et al., 2004; Lera et al., 2006). Questa tipologia di test prevede l'incubazione dei gameti o degli embrioni nelle sostanze tossiche e si considera come end-point la normale formazione embrio-larvale. La valutazione dei parametri fisiologici della motilità spermatica si presenta come una nuova alternativa per la interpretazione di questo tipo di saggio.

La sintesi dei parametri fisiologici della motilità spermatica dei molluschi studiati nel capitolo 3.1 e degli studi precedenti condotti sui molluschi autoctoni mediterranei *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus* (Vitiello et al., 2011; Del Prete et al., 2011) è presentata nella Tabella XX.

Tabella XX: Sintesi della conoscenza dei parametri fisiologici della motilità spermatica dei molluschi marini studiati recentemente dal gruppo di ricerca del Laboratorio di Fisiologia e Criobiologia dell'Università di Napoli *Federico II*. I dati di riferimento sono stati acquisiti per riccio *Paracentrotus lividus*.

| | Tempo di attivazione (min) | Massima classe di motilità | Durata massima motilità (min) | Durata totale della motilità (min) |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| <i>Paracentrotus lividus</i> | 1 | 4,0 ±0,7 | 75 | >90 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 12 | 4,5 ±0,2* | 110* | 340 |
| <i>Tapes decussatus</i> | 10 | 4,0 ±0,5* | 88* | >120 |
| <i>Ostrea edulis</i> | 10 | 3,7 ±0,3 | 19 | 120 |
| <i>Pecten jacobaeus</i> | 35 | 4,2 ±0,5 | 55 | 105 |
| <i>Crassostrea gigas</i> | 5 | 3,5 ±0,2 | 45 | >360 |
| <i>Tapes philippinarum</i> | 8 | 3,0 ±0,2 | 3 | >120 |
| <i>Perna perna</i> | 15 | 3,0 ±0,0 | 20 | >120 |
| <i>Crassostrea brasiliana</i> | 1 | 2,4 ±0,4 | 0 | 90 |
| <i>Crassostrea rhizophorae</i> | 1 | 3,3 ±0,7 | 15 | >60 |
| <i>Nodipecten nodosus</i> | 1 | 5,0 ±0,0* | >240* | >240 |

Sulla base di tali informazioni sono stati evidenziati, come organismi potenzialmente utilizzabili per i saggi di spermio tossicità, i molluschi mediterranei *Mytilus galloprovincialis* e *Tapes decussatus*, e la capasanta autoctona brasiliana *Nodipecten nodosus*.

I parametri più rilevanti in questo tipo di valutazione sono indubbiamente la massima classe di motilità raggiunta e la durata della massima classe di motilità (Fabbrocini et al., 2013). Fisiologicamente questi parametri sono relazionati rispettivamente alla capacità contrattile del flagello associata alle macromolecole contrattili e all'energia di pronto uso della cellula che proviene dal metabolismo mitocondriale.

Per quanto riguarda la durata della massima classe di motilità *N. nodosus* ha esibito una notevole performance riguardo ai valori di riferimento, mentre *M. galloprovincialis* e *T. decussatus* hanno presentato valori accettabili. Tra le specie alloctone allevate in Italia l'ostrica *C. gigas* ha esibito la migliore performance. Tutte queste specie hanno comunque esibito valori simili nel parametro massima classe di motilità raggiunta (classe ≥ 3,0).

Gli spermatozoi di *M. galloprovincialis*, *T. decussatus* e *C. gigas* esibiscono un tempo più lento di attivazione mentre gli spermatozoi di *N. nodosus* si sono attivati subito. Dal punto di vista fisiologico il tempo di attivazione è relazionato all'innesco del processo motile, mediante variazioni della permeabilità ionica nella membrana plasmatica.

La durata totale della motilità è un parametro fisiologico che è relazionato con l'energia di riserva dello spermatozoo. Questo parametro riflette indirettamente il benessere della cellula, cioè, l'estensione della durata totale della motilità è correlata al metabolismo cellulare generale. In riferimento a ciò è stato possibile osservare la buona performance soprattutto del seme di *N. nodosus* e *C. gigas*.

Pertanto il saggio ecotossicologico con molluschi marini si può effettuare incubando per 60 minuti gli spermatozoi attivandoli direttamente nella soluzioni di acqua di mare con i xenobiotici e/o le matrici ambientale, valutando i quattro parametri di motilità.

3.14 Conclusioni

- ✓ *Il CRYO-Ecotest con seme di orata conferma la notevole potenzialità quale “biosaggio universale” per i diversi ecosistemi acquatici da monitorare, con ampi margini di ottimizzazione e di specializzazione in base alle caratteristiche ecologiche ed ambientali delle matrici da monitorare.*

- ✓ *I risultati ottenuti con il seme dei molluschi marini permettono di candidare gli spermatozoi degli specie *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes decussatus* e soprattutto *Nodipecten nodosus* come sistemi biologici potenzialmente utilizzabili per saggi ecotossicologici. La motilità spermatica di queste specie è, infatti, paragonabile a quella di *Paracentrotus lividus*, specie largamente impiegata in saggi di spermiotossicità.*

3.15 Bibliografia

- Arizzi Novelli A, Argese E, Tagliapietra D, Bettiol C, Volpi Ghirardini A (2002) Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-stages of *Paracentrotus lividus* (echinodermata: echinoidea). *Environ Toxicol Chem* 21:859-864.
- Arizzi Novelli A, Losso C, Ghetti PF, Volpi Ghirardini A (2003) Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (echinodermata: echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy. *Environ Toxicol Chem* 22:1295-1301.
- Del Prete F, Silvestri F, Rinna F, Vitiello V, Langellotti AL, Barone CMA, Sansone G. Sperm motility of three mediterranean bivalve molluscs. *World Aquaculture 2011: Book of Abstracts*, Natal, Brazil, 2011.
- Dinnel PA, Stober QJ, Di Julio DH (1981) Sea urchin sperm bioassay for sewage and chlorinated seawater and its relation to fish bioassays. *Mar Environ Res* 5:29-39.
- Dinnel PA, Link JM, Stober QJ (1987) Improved Methodology for a Sea Urchin Sperm Cell Bioassay for Marine Waters. *Arch Environ Contain Toxicol* 16:23-32.
- Fabbrocini A, Lubrano Lavadera S, Rispoli S, Sansone G (2000) Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40:46-53.
- Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Rinna F, Silvestri F, Sorrenti G, Vitiello V, Sansone G (2012a) Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotox Environ Safe* 84:293-298.
- Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Barone CMA, Rinna F, Sessa R, Silvestri F, Villani G, Vitiello V, Sansone G (2013) Motility of cryopreserved spermatozoa for the Ecotoxicological evaluation of aquatic environments. *Chem Ecol (in press)*.
- Lera S, Macchia S, Pellegrini D (2006) Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ Monit Assess* 122:101-109.
- Losso C, Arizzi Novelli A, Picone N, Volpi Ghirardini A, Ghetti PF, Rudello D, Ugo P (2004) Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparisons with chemical analysis data. *Environ Toxicol Chem* 23:396-401.
- Nacci D, Jackim E, Walsh R (1986) Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: Sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and microtox. *Environ Toxicol Chem* 5:521-525.

- Pagano G, Esposito A, Giordano GG (1982) Fertilization and larval development of sea urchins following exposure of gametes and embryos to cadmium. *Arch Environ Contain Toxicol* 11:47-55.
- Sansone G, Fabbrocini A, Zupa A, Lavadera SL, Rispoli S, Matassino D (2001) Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa motility. *Aquaculture* 202:257-268.
- Silvestri F, Rinna F, Del Prete F, Langellotti AL, Vitiello V, Fabbrocini A, Sansone G. Nuovo biosaggio ecotossicologico per sedimenti di ecosistemi acquatici. V Congresso Lagunet, ISMAR, Lesina (FG), Italia, 2011, 55p.
- Stober QJ, Dinnel PA, Crumley SC. Development of the echinoderm sperm bioassay for testing toxic substances. Final Report to US Environmental Protection Agency. FRI-UW-7922, Univ Washington, Seattle, 101 pp. 1979
- Vitiello V. 2011. Applicazioni criobiologiche in acquacoltura e nella gestione delle risorse idrobiologiche. Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari. Università degli Studi di Napoli Federico II. 107p.
- Vitiello V, Carlino PA, Del Prete F, Langellotti AL, Sansone G (2011) Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 63:118-124.

3.16 Glossario

| | |
|------|----------------------------------|
| CPA | Agenti crioprotettivi |
| DMSO | Dimetilsolfossido (C_2H_6SO) |
| EG | Etilen glicole ($C_2H_6O_2$) |
| GLY | Glicerolo ($C_3H_8O_3$) |
| MET | Metanolo (CH_3OH) |
| PG | Propilen glicole ($C_3H_8O_2$) |



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv



Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa

Adele Fabbrocini^{a,*}, Raffaele D'Adamo^a, Francesco Del Prete^{b,c}, Antonio Luca Langellotti^c, Francesca Rinna^b, Fausto Silvestri^b, Gerarda Sorrenti^a, Valentina Vitiello^{b,c}, Giovanni Sansone^{b,c}

^a Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze Marine, via Pola, 4, 71010 Lesina, Foggia, Italy

^b Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Mezzocannone 16, 80134 Napoli, Italy

^c Centro Interdipartimentale di Ricerche per la Gestione delle Risorse Idrobiologiche e per l'Acquacoltura, Università degli Studi di Napoli Federico II, via Università 100, 80055 Portici (NA), Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2012

Received in revised form

24 July 2012

Accepted 25 July 2012

Available online 11 August 2012

Keywords:

Sea bream

Spermatozoa

Cryopreservation

Sperm motility

Ecotoxicological test

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the feasibility of using cryopreserved *S. aurata* semen in spermotoxicity tests. Cryopreservation is a biotechnology that can provide viable gametes and embryos on demand, rather than only in the spawning season, thus overcoming a limitation that has hindered the use of some species in ecotoxicological bioassays.

Firstly, the sperm motility pattern of cryopreserved semen was evaluated after thawing by means of both visual and computer-assisted analyses. Motility parameters in the cryopreserved semen did not change significantly in the first hour after thawing, meaning that they were maintained for long enough to enable their use in spermotoxicity tests. In the second phase of the research, bioassays were performed, using cadmium as the reference toxicant, in order to evaluate the sensitivity of cryopreserved *S. aurata* semen to ecotoxicological contamination.

The sensitivity of the sperm motility parameters used as endpoints (motility percentages and velocities) proved to be comparable to what has been recorded for the fresh semen of other aquatic species (LOECs from 0.02 to 0.03 mg L⁻¹). The test showed good reliability and was found to be rapid and easy to perform, requiring only a small volume of the sample. Moreover, cryopreserved semen is easy to store and transfer and makes it possible to perform bioassays in different sites or at different times with the same batch of semen.

The proposed bioassay is therefore a promising starting point for the development of toxicity tests that are increasingly tailored to the needs of ecotoxicology and environmental quality evaluation strategies.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

AMB14

SPERIMENTAZIONE DI NUOVI BIOSAGGI PER LE INDAGINI ECOTOSSICOLOGICHE: IL TEST DI SPERMIOSSICITÀ CON SEME CRIOPRESERVATO

A. Fabbrocini¹, R. D'Adamo¹, F. Del Prete³, A. L. Langellotti³, F. Rinna³, R. Sessa²,
F. Silvestri³, G. Villani², V. Vitiello² and G. Sansone^{2,3}

¹Istituto di Scienze Marine - UOS Lesina, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy

²Dip. delle Scienze Biologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy

³CRLAcq, Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy

raffaele.dadamo@fg.ismar.cnr.it

I saggi ecotossicologici con gameti ed embrioni di organismi acquatici sono comunemente impiegati nei programmi di monitoraggio ambientale, grazie alla relativa facilità di esecuzione dei test ed alla loro elevata sensibilità. D'altra parte, il loro utilizzo spesso strettamente dipendente dalla stagione riproduttiva, la elevata variabilità biologica e la difficoltà nello stabilire i riproduttori o trasferirli in base alle necessità restringono fortemente il numero di specie da poter inserire nelle batterie di test.

Nell'ambito delle ricerche tese alla messa a punto di nuovi biosaggi, gli autori hanno sperimentato un approccio innovativo: l'utilizzo di gameti criopreservati quale sistema biologico test. La criopreservazione di gameti ed embrioni di specie acquatiche è infatti una biotecnologia ormai ampiamente affermata, che permette di ottenere "on demand" gameti ed embrioni di elevata ed omogenea qualità, potenzialmente utilizzabili non solo a fini acquacolturali, ma anche in campo ecotossicologico. Per la messa a punto di questo CRYO-ecotest sperimentale è stato utilizzato il seme dell'orata *S. aurata*, una specie eurialina diffusa e comunemente allevata nell'area Mediterranea, per la quale la fisiologia della motilità spermatica è stata ampiamente studiata e protocolli per la crioconservazione del seme sono disponibili ormai da diversi anni. Il seme criopreservato è stato scongelato ed immediatamente incubato sia in tossici di riferimento (metalli pesanti, IPA, pesticidi) che in matrici ambientali (sedimenti, percolati); al termine del periodo di incubazione i parametri di motilità sono stati valutati mediante videomicroscopia o sistema computerizzato (SCA – Sperm Class Analyzer®). La sensibilità del sistema biologico "seme criopreservato" e la riproducibilità del CRYO-ecotest sono stati valutati e confrontati con quelli relativi a seme fresco di numerose specie acquatiche.

Il CRYO-ecotest è risultato essere rapido e di facile esecuzione; il seme criopreservato può essere facilmente trasportato e conservato anche per periodi relativamente lunghi, rendendo possibile condurre saggi indipendentemente dalla stagione riproduttiva, con la possibilità di utilizzare in luoghi o in momenti diversi lo stesso batch di seme. Inoltre, l'end point sperimentato non richiede elevate quantità di matrice da testare e soprattutto non prevede l'utilizzo di stadi larvali o di giovanili, aspetto questo molto importante per la scelta dei biosaggi con vertebrati da inserire nelle batterie di test.

In conclusione, considerato l'elevato numero di specie acquatiche (sia invertebrati che vertebrati) per le quali esistono protocolli di criopreservazione di gameti ed embrioni ormai standardizzati, il CRYO-ecotest mostra notevoli potenzialità come punto di partenza per la messa a punto di biosaggi "universali", ovvero estremamente versatili, da poter essere ottimizzati di volta in volta in base alle specifiche caratteristiche ecologiche ed ambientali dell'area da monitorare.

Appendice 3

CRYO-Ecotest: a new tool for the ecotoxicological evaluation of aquatic environments

by A. Fabbrocini^a, R. D'Adamo^a, F. Del Prete^a, A. L. Langellotti^a, F. Rinnà^a, R. Sessa^a,
F. Silvestri^a, G. Villani^a, V. Vitiello^a and G. Sansone^{a,b,c}

^a Istituto di Scienze Marine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Lesina (FG), Italy –
adele.fabbrocini@fg.ismar.cnr.it; raffaele.dadamo@fg.ismar.cnr.it

^b Dip. Biologia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italy - giovanni.sansone@unina.it;
raf_sessa@yahoo.it; giovanni.villaniyn6@alice.it; v_valentina5095@libero.it

^c CRIAcq - Centro Interdipartimentale di Ricerche per la Gestione delle Risorse Idrobiologiche e per l'Acquacoltura,
Portici (NA), Università degli Studi di Napoli "Federico II", Italy - giovanni.sansone@unina.it fdelprete78@libero.it;
silvestrifauto@hotmail.com; francescarinna@virgilio.it; langello@unina.it

Abstract - A new approach in environmental studies has been investigated by authors, who propose the use of cryopreserved biological systems in ecotoxicological bioassays. Aim of this work has been the evaluation of the feasibility of spermotoxicity test using cryopreserved semen of the sea bream *S. aurata*, with sperm motility parameters as *endpoint*. Thawed sperm was incubated in environmental samples and in a reference toxicant; then motility was evaluated by videomicroscopy by both visual and computer assisted analyses. On the basis of the obtained results, the proposed bioassay could be a promising start-point for the development of toxicity tests more and more tailored to the needs of ecotoxicology and environmental quality evaluation strategies for aquatic environments.

Keywords: ecotoxicological test, sperm motility, cryopreservation, sea bream

1. Introduction

Ecotoxicological bioassays using the gametes and embryos of aquatic species are commonly required in integrated environmental monitoring programs due to their high sensitivity to the synergistic and/or antagonistic effects of all components interacting with the biota. On the other hand, many factors limit the use of gametes and embryos in ecotoxicological tests: their availability, often limited to the spawning season, the difficulty in collecting, transferring and storing for long periods, and above all their biological variability (Paredes and Bellas, 2009; Schipper et al., 2008).

Cryopreservation is a biotechnology that provides on demand viable gametes and embryos of homogeneous quality, thus overcoming the main limitations in the use of some species in bioassays; in addition, cryopreserved biological systems could drastically reduce the use of animal models or whole organisms in performing ecotoxicological evaluations.

The sea bream *S. aurata* is a euryhaline species commonly found and intensively reared in the Mediterranean region; semen of this specimen is stored immotile in the gonads in relatively hypo-osmotic fluid and motility is triggered by sea water; the physiology of its sperm motility has been widely studied (Lahnsteiner et al., 2010) and sperm cryopreservation protocols are now available (Fabbrocini et al., 2000); in addition the sensitivity and reliability of sea bream cryopreserved semen has been previously tested in spermotoxicity test using Cd as reference toxicant (Fabbrocini et al., 2012). On these bases, aim of this work has been the evaluation of the sensitivity and reliability of sea bream cryopreserved semen using two environmental samples (sediment elutriate, dumpsite leachate) as tested matrices, in order to evaluate the feasibility of the CRYO-Ecotest: a spermotoxicity test performed using cryopreserved semen of the sea bream *S. aurata*, with sperm motility parameters as *endpoints*, that could allow evaluations for a wide range of aquatic ecosystems.

2. Materials and methods

2.1 Semen cryopreservation

The semen was collected by abdominal stripping from adult male sea bream bred intensively. Samples found to have poor motility or contaminated by faeces or urine were discarded; subsequently, pools of semen were made up for every five best males. Semen was cryopreserved according the procedure described in Fabbrocini et al. (2000). Briefly, semen was diluted at a ratio of 1:6 in 1% NaCl (motility inhibitor medium) containing 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), frozen at a gradient of 10 °C min⁻¹ to -150 °C, and finally immersed in liquid nitrogen up to 24 months.

2.2 Motility evaluation

* Corresponding author. Dip. Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, v. Mezzocannone 8, 80134 Napoli. Tel. +39 081 2534599; fax +39 081 2535090

P-207

EFFECT OF SHORT-TERM CONSERVATION AND EXPOSURE TO FIVE DIFFERENT CRYOPROTECTANTS ON SPERM MOTILITY OF *PAGELLUS ERYTHRINUS* (L.)

Valentina Vitiello¹, Antonio Luca Langellotti¹, Francesco Del Prete¹, Fausto Silvestri^{1,2}, Francesca Rinna¹, Giovanni Sansone^{1,3}

¹ Interdepartmental Research Center for Hydrobiological Resources Management and for Aquaculture, CRIACq, University of Naples Federico II, Via Università, Naples, Italy

² The CAPES Foundation – Ministry of Education of Brazil, Brazil

³ Department of Biological Sciences - University of Naples Federico II, Naples, Italy

E-mail: valentina.vitiello@unina.it

Introduction

The common pandora, *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758), is an important species for fisheries and one of the most promising species for diversification of marine aquaculture in the Mediterranean Sea (Klaoudatos et al. 2004).

Successful storage of fish sperm in liquid nitrogen has been achieved in several fish species, but the procedures for fish sperm cryopreservation differ from species to species (Tanaka et al. 2002).

Although there are works on the morphology and seasonal fluctuations in sperm quality of common pandora (Mancicchio et al. 2004; Lechekhab 2007), there are not studies on semen cryopreservation of this specie. In the present study, the effects on sperm motility after short-term conservation (until 72 hours) and after incubation in five different cryoprotectants were examined; this experimentation represents a preliminary step for the development of a cryopreservation protocol for sperm of common pandora.

Materials and methods

Seminal fluid was obtained by abdomen stripping of at least 10 adult mature males, previously anesthetized, bred in a Mediterranean fish farm (Panitica Pugliese, Apulia, Italy). The semen was collected individually and maintained at a temperature of $3 \pm 1^\circ\text{C}$. Individual semen samples showing better motility were mixed in homogeneous pools. All activations were made by dilution 1:100 with filtered seawater ($0.2 \mu\text{m}$, 36‰, 8.1 pH) at $18 \pm 1^\circ\text{C}$, evaluating the percentage of motile spermatozoa and the quality of their movement, as described in Fabbrocini et al. (2000). Four values were recorded to describe the motility sperm curve: time to reach the maximum motility (activation time), maximum motility value, duration of maximum motility and total time of motility (until class 0). To evaluate short-term conservation, aliquots of dry semen and diluted semen (1:6 in 1% NaCl - inhibitor of motility) were placed at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark and activated 6, 24, 48 and 72h after sampling. The maximum class and the total duration of sperm motility were recorded. For cryoprotectants toxicity evaluation, the sperm diluted 1:6 with a solution of 1% NaCl (v/v) and containing the cryoprotectants, was incubated at $18 \pm 1^\circ\text{C}$. The following cryoprotectants were tested: dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), glycerol (GLOH) at 5-7-10-15-20 % v/v and methanol (MetOH) at 2-4-6-8-10 % v/v. After 10, 20 and 30 minutes, aliquots of sperm suspensions were activated and the maximum motility classes recorded.

Results

The sperm motility values were reported in Table 1. After collection, the *P. erythrinus* sperm is characterized by a very fast activation time (1 min), a maximum motility corresponding to percentage of RVL sperm (rapid, vigorous and linear) over 80% (class 4), the maintenance of sperm motility over class 3 for 10 min and 30 min of total total duration of motility. Dry semen kept at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ showed a significant ($p < 0.05$) reduction in sperm motility already after 24 h, with decay in maximum class, duration of maximum class and total duration of motility. The dilution with 1% NaCl induced a reduction in maximum class of motility already after 6 h of incubation, while it allowed a better duration of the highest class and the total duration of motility until 72 h. The activation time did not show any significant modification (data not shown).

Table 1. Motility parameters of *P. erythrinus* semen: [a] maximum motility value (motility class, mean \pm sd), [b] duration of maximum motility values (min) and [c] total time of motility (until class 0) (min)

| Motility parameters | Activation after pool formation (0h) | Dry conservation at 3 \pm 1°C | | | | 1% NaCl dilution (1:6) conservation at 3 \pm 1°C | | | |
|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|--|---------------|---------------|---------------|
| | | 6h | 24h | 48h | 72h | 6h | 24h | 48h | 72h |
| [a] (class) | 4.2 \pm 0.2 | 4.0 \pm 0.2 | 3.5 \pm 0.2 | 3.5 \pm 0.3 | 3.5 \pm 0.3 | 3.3 \pm 0.2 | 3.1 \pm 0.3 | 3.0 \pm 0.3 | 3.0 \pm 0.2 |
| [b] (min) | 10 | 10 | 5 | 5 | 2 | 10 | 10 | 7 | 3 |
| [c] (min) | 30 | 30 | 25 | 25 | 20 | 30 | 30 | 30 | 15 |

DMSO and EG were found to be the less toxic cryoprotectants (Table 2): their concentrations up to 10% did not induce significant differences in sperm motility compared to the control, even after 30 min of incubation. The other cryoprotectants tested (PG, GlOH, MetOH) showed higher levels of toxicity already at 10 min of incubation time.

Table 2. Maximum percentage (v/v) of cryoprotectants that gave values of sperm motility statistically not different from control ($p > 0.05$) after 10, 20 and 30 min of incubation

| | DMSO (%v/v) | EG (%v/v) | PG (%v/v) | GlOH (%v/v) | MetOH (%v/v) |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------------|--------------|
| 10 min | 15 | 15 | 10 | 10 | 6 |
| 20 min | 15 | 15 | 10 | 10 | 4 |
| 30 min | 10 | 10 | 5 | 7 | 4 |

Discussion and conclusions

Common pandora showed a motility sperm pattern similar to other marine fish, with a high initial value and a decline in few minutes after activation (Cosson et al. 2008); differences were recorded in total time of sperm motility respect to data of Lechekhab (2007), that reported total motility duration ranging from 35 (in August) to 60 min (in July) in common pandora adults males bred in Algeria. The best short-term conservation procedure until 24 h after the sperm collection was obtained by diluting the semen with 1% NaCl and kept at 3 \pm 1°C.

The effects on sperm motility obtained after exposure to cryoprotectants showed considerable differences respect to the results reported for seabream in Fabbrocini et al. (2000) and for seabass in Sansone et al. (2002). In particular, common pandora showed lower effects on sperm motility after exposure to all cryoprotectants tested. The results obtained in this work will be useful to develop an effective cryopreservation protocol for *P. erythrinus* spermatozoa.

References

- Cosson, J.; Groison, A.-L.; Suquet, M.; Fauvel, C.; Dreanno, C.; Billard, R. 2008: Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 460-486.
- Fabbrocini, A.; Lubrano Lavadera, S.; Rispoli, S.; Sansone, G., 2000: Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40, 46-53.
- Klaoudatos, S.D.; Iakovopoulos, G.; Klaoudatos, D.S., 2004: *Pagellus erythrinus* (common pandora): a promising candidate species for enlarging the diversity of aquaculture production. *Aquaculture Inter.* 12, 299-320.
- Lechekhab, S., 2007: Contribution à l'étude de la fertilité chez *Pagellus erythrinus*: spermogramme et spermocytogramme. *Cybiu* 31(2), 245-249.
- Maricchiolo, G.; Genovese, L.; Laurà, R.; Micale, V.; Muglia, U., 2004: Fine structure of spermatozoa in the common pandora (*Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758) (Perciformes, Sparidae). *Histol. Histopathol.* 19, 1237-1240.
- Sansone, G.; Fabbrocini, A.; Ieropoli, S.; Langellotti, A.L.; Occidente, M.; Matassino, D., 2002: Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44, 229-239.
- Tanaka, S.; Zhang, H.; Horie, N.; Yamada, Y.; Okamura, A.; Utoh, T.; Mikawa, N.; Oka, H.P.; Kurokura, H., 2002: Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J. of Fish Biol.* 60, 139-146.

Appendice 5

Nuovo biosaggio ecotossicologico per sedimenti di ecosistemi acquatici

Silvestri F., Rinna F., Del Prete F., Langellotti A.L., Vitiello V.,¹Fabbrocini A. & Sansone G.

Università di Napoli Federico II – Dip. delle Scienze Biologiche, Lab. Fisiologia ambientale e degli organismi acquatici & Criobiologia, Via Mezzocannone 16, 80134 Napoli & CRIAcq Via Università 100, 80055 Portici (NA). ¹Istituto di Scienze Marine – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Pola 4, 71010 Lesina (FG)
giovanni.sansone@unina.it

I saggi ecotossicologici rappresentano uno strumento utile per l'identificazione precoce di situazioni di rischio per il biota, capaci di rilevare gli effetti dei tossici anche a basse concentrazioni, permettendo di scegliere le specie target in base all'importanza che rivestono nell'ecosistema in esame e/o alla loro sensibilità.

L'orata *Sparus aurata*, specie ampiamente allevata, offre la possibilità di avere una continua ed elevata disponibilità di spermatozoi durante la stagione riproduttiva (ottobre-marzo); inoltre la buona criopreservabilità di tale seme rende disponibili stocks omogenei di spermatozoi tutto l'anno per l'effettuazione di saggi ecotossicologici, garantendo una maggiore omogeneità di standard qualitativo e rendendo più affidabili e riproducibili i test.

L'obiettivo della presente ricerca è stato la messa a punto di un test ecotossicologico per la valutazione di sedimenti dei diversi ecosistemi acquatici (marini, di transizione e dulciacquicoli), utilizzando seme fresco e criopreservato di *S. aurata*.

Il test progettato prevede l'esposizione del seme alla matrice da saggiare in un medium di incubazione specifico (60-180min) e la successiva valutazione dei parametri di motilità spermatica con modalità visual e/o computerizzata.

Il biosaggio sperimentato ha mostrato elevata facilità di gestione, affidabilità, ripetibilità ed una buona confrontabilità con saggi già normati.

Appendice 6

SPERM MOTILITY OF MEDITERRANEAN AQUACULTURED FINFISH SPECIES

V. Vitiello, F. Silvestri*, F. Rinna, F. Del Prete, A. L. Langellotti, C. M. A. Barone and G. Sansone

Centro interdipartimentale di ricerche per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura – CRIAcq
Università degli Studi di Napoli "Federico II" - Italy
CAPES Foundation - Brazil
silvestrifauto@hotmail.com

In the present study we evaluated the sperm motility of four finfish species reared in Mediterranean seafarms: European seabass (*Dicentrarchus labrax*), Gilthead seabream (*Sparus aurata*), Sharpshout seabream (*Diplodus puntazzo*) and Common Pandora (*Pagellus erythrinus*) to improve reproductive techniques and develop cryopreservation protocols.

Samples of sperm were collected from mature individuals maintained in commercial hatcheries. Each pool of sperm was activated with 1:100 dilution in filtered seawater (0.45 µm) and kept at 20 ±2°C. Sperm motility was evaluated with inverted phase contrast microscope (200x). Percentage of active sperms and the quality of movement were assessed. Final results were expressed in classes of motility.

The considered physiological parameters (Table 1) have proved as good indicators for evaluation of sperm quality. The sperms of *S. aurata* and *P. erythrinus* showed maximum duration of best motility class that was maintained for more than 10 minutes.

Table 1. Physiological parameters of sperm motility (22 ±2°C) of four Mediterranean finfish species.

| | Activation time* (sec) | Total time of motility (min) | Maximum class of motility (1.0 ~ 5.0) | Duration of max. motility (>3 class) (min) |
|-----------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--|
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | 10" | 3' | 4.5 ±0.5 | 1,5' |
| <i>Sparus aurata</i> | 30" | 25' | 4.5 ±0.5 | 15' |
| <i>Diplodus puntazzo</i> | 30" | 7' | 4.5 ±0.5 | 1' |
| <i>Pagellus erythrinus</i> | 60" | 30' | 4.5 ±0.5 | 10' |

* Time to reach the maximum motility value.

Appendice 7

SPERM MOTILITY OF THREE MEDITERRANEAN BIVALVE MOLLUSCS

F. Del Prete, F. Silvestri*, F. Rinna, V. Vitiello, A. L. Langellotti, C. M. A. Barone and G. Sansone

Centro interdipartimentale di ricerche per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura – CRIAcq
Università degli Studi di Napoli "Federico II" - Italy
CAPES Foundation - Brazil
silvestrifauto@hotmail.com

The underlying knowledge of sperm physiological behavior is a key factor to improve breeding techniques of aquatic species as the bivalve molluscs. In this study sperm motility of mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*), european flat oyster (*Ostrea edulis*) and mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*) was evaluated.

The experiments were conducted with a minimum of 30 mature male individuals of each species kept in ripe stage. The sperm was biotically obtained from mollusc gonads, avoiding water and other tissues contaminations. The semen was activated in filtered sea water (0.45 μ m), with a dilution ratio 1:100 (v/v), and kept at 18°C. The sperm motility was evaluated through inverted phase contrast microscope (200x) and percentage of active sperms as well as the quality of movement were assessed. Final results were expressed in classes of motility.

The trend of sperm motility (Fig. 1) showed significant differences among the three species ($p < 0,05$). Particularly the differences were observed for the following parameters: (1) time to reach the maximum motility value (activation time); (2) motility duration class values > 3 ; (3) total time of motility. Only the maximum motility values showed no differences among the three species. These results will be essential to develop fertilization protocols or cryopreservation procedures and they could also be used to evaluate potential ecotoxicity of aquatic pollutants with deleterious effect on sperm motility.

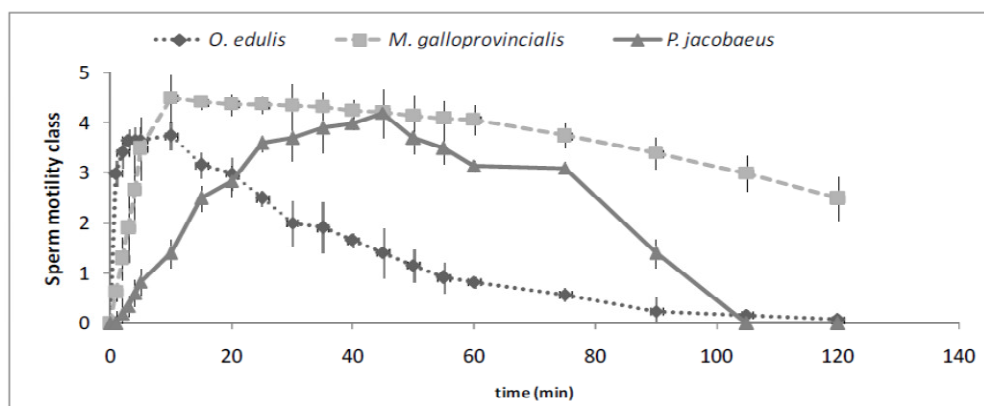


Figure 1. Sperm motility of *O. edulis*, *M. galloprovincialis* and *P. jacobaeus*.

Ringraziamenti

Ringrazio con affetto il professore Giovanni Sansone per suoi preziosi insegnamenti, per avermi guidato durante tutto il percorso del dottorato e soprattutto, per l'indimenticabile accoglienza in questo periodo.

Ringrazio la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agenzia del Ministero dell'Educazione/Brasile, per la concessione della borsa di studio e la Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro per il periodo di licenza accordato.

Ringrazio tutte gli enti e aziende che hanno collaborato con questo lavoro: IRSVEM S.r.l., Pannitica Pugliese, Stazione Zoologica di Napoli Anton Dohrn, CNR/ISMAR di Lesina (FG) e particolarmente, il professore Jaime Fernando Ferreira i tutti i collaboratori del Laboratorio de Moluscos Marinhos dell'Università Federale di Santa Catarina (LMM/USFC), Florianopolis, Brasile.

Ringrazio al Centro Internacional de Altos Estudios Agronomicos Mediterraneos di Zaragoza (CIHEAM) per la concessione della borsa di studio per la partecipazione nel corso "Monitoring environmental effects of aquaculture" e al Dipartimento di Agraria per il supporto nei congressi.

Ringrazio tutti i collaboratori del prof. Sansone, in particolare il grande amico dott. Francesco del Prete.

Ringraziamento speciale alla Famiglia Silvestri per la splendida accoglienza, il sostegno e l'assistenza data in questo periodo, particolarmente agli zii Francesco e Filomena (non dimenticherei mai!!!).

Infine ringrazio tutta la mia famiglia in Brasile, particolarmente: Ligia, Giovanna, Pai, Mãe, Nana, Bebê e Silvana... è difficile vivere lontano da voi!

Grazie a Dio, per avermi condotto a questo sentiero, e per tutte le esperienze e l'emozione vissute in questo periodo...